Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung: Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. K. Botzenhart

Wirkung zweier Exoproteasen von Pseudomonas aeruginosa auf menschliche Fibroblasten, Granulozyten, Lymphozyten und auf Mausmilzzellen

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARGA INGRID MAYER
aus Ludwigsburg

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0113

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung: Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. K. Botzenhart

Wirkung zweier Exoproteasen von Pseudomonas aeruginosa auf menschliche Fibroblasten, Granulozyten, Lymphozyten und auf Mausmilzzellen

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARGA INGRID MAYER
aus Ludwigsburg

1986

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. K. Botzenhart Tübingen
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. F. Lingens Stuttgart-Hohenheim

---

gedruckt 1986 bei H.-J. Köhler , Reprografischer Betrieb , Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde am Hygiene-Institut Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Konrad Botzenhart durchgeführt.

Für das Überlassen des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. med. Konrad Botzenhart.

Bei Herrn Dr. Gerd Döring möchte ich mich für die ständige Betreuung während meiner Arbeit und für die anregenden Diskussionen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bessler, Lehrstuhl für Mikrobiologie II der Universität Tübingen, der mir Labor, Versuchstiere, Medien und sonstiges Material für die Stimulationsversuche zur Verfügung stellte; besonders bedanken möchte ich mich bei seinen Assistentinnen, Frau Margret Pfeiffer und Frau Marianne Cox, die die Stimulation der Mausmilzzellen durchführten.

Bei Herrn Milojko Gencic aus der Abteilung für Medizinische Virologie des Hygiene-Instituts möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung in die Technik der Zellkultivierung bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Hygiene-Instituts, vor allem bei den Mitarbeitern des Labors Dr. Döring, Herrn Walter Goldstein, Herrn Alfred Röll und Frau Maria Haug, die mir bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL	7
2.1.	Reagenzien und Chemikalien	7
2.2.	Organismen und Zellen	10
3.	METHODEN	11
3.1.	Reinigung der alkalischen Protease und Elastase	11
3.1.1.	Proteinbestimmung	12
3.1.2.	Azocaseintest	13
3.1.3.	Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO)	13
3.2.	Kultivierung der Fibroblasten	15
3.2.1.	Bestimmung der Zellvitalität	16
3.3.	Gewinnung von menschlichen Lymphozyten und Granulozyten	16
3.4.	Präparation der Mausmilzzellen	17
3.5.	Wirkung von alkalischer Protease und Elastase auf Fibroblasten	18
3.6.	Adhärenz von alkalischer Protease und Elastase an Lymphozyten, Granulozyten und an Mausmilzzellen	19
3.7.	Cytotoxizität gegenüber Lymphozyten und Granulozyten	21
3.8.	Stimulationsversuche mit Mausmilzzellen	22
4.	ERGEBNISSE	24
4.1.	Wirkung von alkalischer Protease und Elastase auf Fibroblasten	24
4.2.	Adhärenz von alkalischer Protease und Elastase an Lymphozyten, Granulozyten und an Mausmilzzellen	29
4.3.	Cytotoxizität gegenüber Lymphozyten und Granulozyten	31
4.4.	Stimulationsversuche mit Mausmilzzellen	31

Seite

5. DISKUSSION 49

6. ZUSAMMENFASSUNG 57

7. LITERATURVERZEICHNIS 59

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AP	Alkalische Protease
Con A	Concanavalin A
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Ela	Elastase
HBSS	Hanks balanced salt solution
KDO	Keto-Desoxyoctonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	minimal essential medium
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBS	phosphate buffered saline
RIA	radioimmunoassay
RPMI-1640	Firmeninterne Medium-Bezeichnung
SDS	sodiumdodecylsulfate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	trypticase soy broth

1. EINLEITUNG

Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) ist ein gram-negatives Bakterium, das in der Natur in der Erde und im Wasser weit verbreitet ist und auch saprophytisch auf Pflanzen lebt (10).

P. aeruginosa hat nun zunehmende Bedeutung als pathogener Keim erlangt; zum einen durch seine Resistenz gegen die meisten Antibiotika, die teilweise schon bei der ersten Antibiotikabehandlung eines Patienten auftritt (66); zum anderen durch sein gehäuftes Auftreten in Personen, die einer bestimmten Risikogruppe angehören.
Dies sind vor allem Patienten mit Verbrennungen, mit Leukopenien, Empfänger von Organtransplantaten und Patienten, die an bestimmten malignen Erkrankungen, an chronischen Lungenerkrankungen und an Cystischer Fibrose leiden. Besonders gefährdet sind auch Patienten, die mit Beatmungsgeräten therapiert werden, und Personen, die über längere Zeit katheterisiert werden (44).

Unter ungünstigen Wirtsbedingungen, das heißt bei intaktem Immunsystem, und auch bei chronischen Erkrankungen, werden vorwiegend von einer schleimigen Exopolysaccharidkapsel umgebene Mikrokolonien gebildet.
Der Schleimfilm der Mikrokolonien schützt das Bakterium vor dem Immunsystem des Körpers und vor der Therapie mit Antibiotika (62). Er wird daher auch als Virulenzfaktor betrachtet (10).

Unter günstigen Bedingungen werden vor allem Schwärmerzellen gebildet, die sich teilen, über das Blut verteilt werden und neues Gewebe kolonisieren; dies führt zum Beispiel zur Sepsis bei Verbrennungen und zu akuter hämorrhagischer Pneumonie (10).

Von allen Organinfektionen ist die Infektion der Lunge mit der höchsten Mortalität behaftet (57).
Besonders Patienten mit Cystischer Fibrose weisen chronische Lungeninfektionen mit P. aeruginosa auf, die die Prognose der Patienten wesentlich bestimmen (22, 23).

Nach Woods et al. (84) findet die Adhärenz von P. aeruginosa an das Epithel des oberen Respirationstrakts über Pili oder Fimbrien statt. Er konnte zudem zeigen, daß der Verlust von Fibronektin, einem an der Zelloberfläche vorkommenden Glykoprotein, zur vermehrten Adhärenz von P. aeruginosa und anderen gram-negativen Bakterien führt (85).

Ernsthafte P. aeruginosa-Infektionen kommen bei gesunden Patienten nicht vor, da ein intaktes Immunsystem die Bakterien schnell eliminiert.

Die Immunabwehr wird durch das unspezifische und das spezifische Immunsystem gewährleistet. Das unspezifische Immunsystem umfaßt Haut- und Schleimhautbarrieren, das Komplementsystem, und phagozytierende Zellen, Granulozyten und Monozyten; das spezifische umfaßt das humorale und zelluläre Immunsystem, bestehend aus B- und T-Lymphozyten (28).

Eine bakterielle Invasion wird normalerweise durch die Integrität von Haut- und Schleimhautepithel verhindert. Ist diese Barriere von Bakterien durchbrochen, werden die Bakterien durch phagozytierende Zellen eliminiert. Die Phagozytose wird durch Opsonierung der Bakterien, die über die Aktivierung des Komplementsystems stattfindet, erleichtert (28, 67).

Die Aktivierung des zellulären Immunsystems führt zur Proliferation von T-Lymphozyten. Diese können als T-Helfer- oder T-Suppressor-Zellen zusammen mit Makrophagen und B-Lymphozyten direkt bei der humoralen Immunabwehr mitwirken oder über die Bildung von Lymphokininen auf andere

Zellen wie Makrophagen oder Granulozyten einwirken (28).

Die Aktivierung des humoralen Immunsystems führt zur Differenzierung von B-Lymphozyten und zur Sekretion von Immunglobulinen. Eine wichtige Rolle spielt das sekretorische IgA (s-IgA), das bei lokaler antigener Stimulation von Schleimhautoberflächen gebildet wird und die Adhärenz von Bakterien verhindern soll (21, 28).

Die Virulenz eines Mikroorganismus ist definiert durch seine Fähigkeit, in einen geeigneten Wirt einzudringen, sich dort zu vermehren, eine lokale oder systemische Erkrankung zu verursachen und schließlich den Wirt zu überwinden und zu töten (62).

P. aeruginosa produziert neben dem Schleimfilm, den Flagellen und seinem Lipopolysaccharid eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme, die seine Virulenz ausmachen. Dazu gehören Exotoxin A, Exoenzym S, Hämolysine und zwei Proteasen (62).

Die beiden Proteasen wurden zuerst von Morihara untersucht und charakterisiert (41, 42):
eine alkalische Protease (AP) mit einem Molekulargewicht von 59 000, mit optimaler proteolytischer Aktivität gegenüber Casein zwischen pH 9 und 10, und eine Protease mit einem Molekulargewicht von 36 000, mit optimaler proteolytischer Aktivität gegenüber Casein zwischen pH 8 und 9, die zusätzlich denaturiertes Elastin spaltet und daher Elastase (Ela) genannt wurde.
Beide Enzyme sind Exoproteasen und werden schon in der frühen Wachstumsphase von P. aeruginosa gebildet, wobei in vitro mehr als ein Gramm AP pro Liter Kulturmedium gebildet werden kann (41).
Mehr als 90 % der von Döring et al. (15) untersuchten P. aeruginosa-Stämme produzierten in vitro beide Proteasen in verschiedener Menge. In vivo-Untersuchungen wiesen nach, daß AP und Ela mindestens im Nanogrammbereich gebildet werden (15).

AP und Ela wurden bisher eingehend untersucht, und es wurde aufgrund verschiedener Beobachtungen, besonders im Tiermodell, vermutet, daß sie wesentliche Virulenzfaktoren von P. aeruginosa sind:
Es wurde eine Korrelation zwischen Proteasenproduktion und Virulenz (56, 72), und eine Korrelation zwischen Proteasenproduktion und Mortalität nachgewiesen (24). Andere Autoren sehen die Virulenz der Proteasen AP und Ela darin, daß diese die Wachstumsrate von P. aeruginosa in normaler und verbrannter Haut vergrößern, indem sie Nährstoffe modifizieren (9). Gegenüber Exotoxin A sollen AP und Ela eine synergistische oder additive Rolle bei der Ausprägung der vollständigen Virulenz spielen (72). Neuere Untersuchungen zeigen, daß die Virulenz von P. aeruginosa multifaktoriell ist, und daß die Enzyme AP, Ela, Exotoxin A und Exoenzym S jeweils zu verschiedenen Anteilen an der Ausprägung der unterschiedlichen Erkrankungen beteiligt sind (48).

Eine wesentliche Eigenschaft der beiden Proteasen ist die, einen toxischen Effekt auf eine Vielzahl von Organen und Geweben auszuüben:
Durch AP und Ela verursachte hämorrhagische Nekrosen wurden in der Haut (36), in der Cornea (34, 35) und im Intestinaltrakt (52) nachgewiesen.
In der Lunge führen die Proteasen zu Nekrosen von Epithelzellen, Kapillarendothelien und Alveolarspeten (20, 27). Die wichtigsten Protease-Inhibitoren der Lunge, α-1-Antiprotease und der Bronchialschleimhaut-Inhibitor, der die oberen Luftwege vor der Proteolyse durch Leukozyten-Elastase und Kathepsin G schützt, werden durch Ela inaktiviert (32, 43).
Döring et al. (16) konnten kürzlich zeigen, daß Ela in vitro Leukozyten-Elastase spalten kann. Diese endogene Protease soll zur Zerstörung der Lunge in Patienten mit Cystischer Fibrose beitragen (17, 75). Die Bedeutung dieser Spaltung durch Ela für in vivo-Verhältnisse ist noch unklar (17).

Die klinische Bedeutung von AP und Ela wird daraus ersichtlich, daß in den Bronchialsekreten von 83 - 88 % der Patienten mit Cystischer Fibrose und gleichzeitig nachweisbaren P. aeruginosa-Infektionen Antikörper gegen AP und Ela nachweisbar sind; 93 % der aus den Patienten isolierten Stämme bildeten beide Proteasen (13, 14).
Eine Longitudinalstudie an Patienten mit Cystischer Fibrose wies über Jahre ansteigende Antikörpertiter gegen AP und Ela nach (13); beide Proteasen scheinen daher während einer Lungeninfektion mit P. aeruginosa ständig gebildet zu werden.
Beide Proteasen wurden auch in Immunkomplexen im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose nachgewiesen. Immunkomplexe sollen bei diesen Patienten im späteren Stadium an der Zerstörung der Lunge beteiligt sein (16).

Verschiedene Komponenten des Komplementsystems, nämlich freies C1, C3, C5, C8, C9 und zellgebundenes C1 und C3 werden durch Ela inaktiviert. Dies führt zu einer Reduktion der Phagozytose durch Granulozyten (69).

Sowohl AP als auch Ela üben einen proteolytischen Effekt auf Immunglobuline aus. Es wurde gezeigt, daß Ela in vitro im Humanserum vorhandenes IgG1, IgA1 und s-IgA spalten kann, während die AP nur IgA1 spaltet (11). Die Spaltung von IgG durch Ela konnte auch in vivo nachgewiesen werden (15, 25); Ela-positive P. aeruginosa-Stämme führen in Mäusen mit experimentellen Verbrennungen zu einem Abfall des Serum-IgG-Spiegels und dadurch zu erhöhter Mortalität (25).

Im Vergleich zu den vielen Untersuchungen über AP und Ela in vitro und in vivo mit Hilfe von Tiermodellen gibt es nur wenige Untersuchungen über die direkte Wirkung von AP und Ela auf Zellen und Zellkulturen.
Kharazmi et al. (37, 38) berichteten über einen Einfluß von AP und Ela auf Chemotaxis und Chemolumineszenz von Granulozyten. Andere Autoren dagegen konnten keine direkte Wirkung

der Proteasen auf phagozytierende Zellen nachweisen (83). Ein Effekt von AP und Ela auf Lymphozyten wurde bisher lediglich von Parmely et al. (55) nachgewiesen.

Ziel der Arbeit war es, AP und Ela aus P. aeruginosa zu isolieren und ihre Wirkung auf menschliche Fibroblasten, Granulozyten, Lymphozyten und auf Mausmilzzellen zu untersuchen.

2. MATERIAL

2.1. Reagenzien und Chemikalien

Puffer und Medien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Serva Feinbiochemie GmbH, Heidelberg:

MEM; Minimum Essential Medium mit Hank's Salzen (1x) mit Natriumbikarbonat (0,35 g/l) ohne L-Glutamin

L-Glutaminlösung, 200 mM/l
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10 000 E, 10 000 µg/ml
Trypsin 1:250 from bovine pancreas, 4 U/mg material

PBS; Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca und Mg-Salze, NaCl: 8000 mg/l; KCl: 200 mg/l; KH_2PO_4: 200 mg/l; Na_2HPO_4: 1000 mg/l; NaH_2PO_4: 150 mg/l

GIBCO EUROPE, Eggenstein-Leopoldshafen:

HBSS; Hank's balanced salt solution (1x) without phenol red
RPMI-1640 (1x) mit 25 mM Hepes mit L-Glutamin

Flow Laboratories, Meckenheim:

Hitzeinaktiviertes foetales Kälberserum
Lymphozyten-Separationsmedium

Div. Becton & Co., Cockeysville, USA:

Trypticase soy broth

Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA:

Bacto-Yeast-Extract

Zusammensetzung der verwendeten Medien

$RPMI\text{-}1640_a$: RPMI-1640 mit 2 mM/l Glutamin und 100 E/ml, 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin

$RPMI\text{-}1640_b$: Dem RPMI-1640 wurde auf 100 ml 11 ml von RPMI-1640 βPSG-Konzentrat zugegeben.

RPMI-1640 βPSG (RPMI-1640 konzentriert):

100 ml RPMI-1640
20 ml α-Glutamin, 200 mM
10 ml Penicillin/Streptomycin, 10 000 E / 10 000 µg/ml
400 µl β-Mercaptoäthanol

β-Mercaptoäthanol-Stammlösung:

100 µl β-Mercaptoäthanol konzentriert und 9,9 ml RPMI

MEM_a: MEM mit 2 mM/l Glutamin und 100 E/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

Medium für die Vorkultur zur Anzucht von P.aeruginosa:

30 g/l Trypticase soy broth

Medium für die Hauptkultur von P.aeruginosa:

30 g/l Trypticase soy broth
5 g/l Glucose
5 g/l Hefeextrakt

Chemikalien und andere Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Chemie GmbH, München:

Trypanblau
Azocasein
Polymyxin B sulfat

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Dextran T 500
Concanavalin A, immobilisiert

Behring-Werke AG, Marburg:

Kaninchen-Komplement
Serum-Albumin vom Rind

Braun, Melsungen

Isotonische Kochsalzlösung

Amersham Buchler GmbH & Co., Braunschweig:

Methyl-^{3}H-Thymidin, wässrige Lösung, TRA 120, 5 Ci/mmol
0,5 ml und 38,5 ml MEM
^{125}I, carrier-free, 5 mCi, 100 mCi/ml

Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt:

Quickszint 501 Szintillationsflüssigkeit

Wenn nicht anders aufgeführt, handelt es sich um Substanzen der Firma Merck AG, Darmstadt.

2.2. Organismen und Zellen

Pseudomonas aeruginosa:
Laborstamm Nr. 78 und 81, isoliert aus Patienten mit Cystischer Fibrose.

Mäuse zur Isolierung der Milzzellen:
Stamm C_3H/HeJ, Jackson Laboratories, Bar Harbour, Maine, USA

Fibroblasten:
Lungenfibroblasten aus menschlichen Föten von der Frauenklinik Tübingen

3. METHODEN

3.1. Reinigung der alkalischen Protease und Elastase

Die Reinigung der beiden Proteasen erfolgte nach Obernesser et al. (50).

Für die Gewinnung der AP wurde P. aeruginosa Nr. 78, für die Gewinnung der Ela P. aeruginosa Nr. 81 verwendet. Beide Stämme wurden jeweils auf Blutagarplatten 22 h bei 37°C angezogen.
Die Vorkulturen wurden in 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit 20 ml TSB-Medium bei 30°C und 130 U/min 12 h in der rotierenden Schüttelmaschine (Infors AG, Basel, Schweiz) inkubiert. Die Hauptkulturen wurden in 1000 ml Erlenmeyer-Kolben mit Schikane mit 200 ml TSB-Medium ebenfalls bei 30°C und 130 U/min 22 h in der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert.
Dann wurde in der Sorvall-Zentrifuge (RC-5B, Du Pont Instruments, Bad Nauheim) 20 min bei 11000 U/min abzentrifugiert. Die Überstände der beiden Stämme wurden bei 4°C mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu 65 % Sättigung versetzt. Der Niederschlag wurde bei 6000 U/min in der Sorvall-Zentrifuge 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, gelöst, anschließend mit Aceton zu 70 % bei -20°C gesättigt und dann 2 h bei -20°C aufbewahrt.
Der weiße Niederschlag wurde 10 min bei 10000 U/min abzentrifugiert und dann in wenig 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, dem 0,2 M NaCl zugesetzt worden war, aufgenommen und auf einer Sephadex G-100 superfine-Säule (2.5 x 60 cm; Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit obigem Puffer chromatographiert. 5 ml-Fraktionen wurden gesammelt und mit dem Azocaseintest auf proteasehaltige Fraktionen getestet.
Diese wurden gesammelt und mit 0,01 M Tris/HCl-Puffer,

pH 7,6, 24 h dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE-Sephacel-Säule mit etwa 5 ml Volumen (1,5 x 20 cm; Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgegeben und mit einem stufenweisen NaCl-Gradienten chromatographiert (0,01 - 0,5 M). Die Elastase wird bei 0,05 M NaCl, die alkalische Protease bei 0,25 M NaCl eluiert.
Die Enzyme wurden anschließend mit der SDS-Gelelektrophorese, modifiziert nach Lämmli (39), mit einem 4 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel und Silberfärbung nach Oakley et al. (49) auf ihre Reinheit getestet.

Für die Stimulationsversuche wurden die Proteasen AP und Ela in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 24 h bei 4°C gegen MEM-Medium dialysiert. Vor und nach Dialyse wurde der Azocaseintest durchgeführt, um einen Verlust der enzymatischen Aktivität auszuschließen. Die Hitzeinaktivierung der Proteasen erfolgte 15 min im Dampftopf. Der Verlust der proteolytischen Aktivität wurde mit dem Azocaseintest nachgewiesen.

3.1.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Enzyme erfolgte nach einer Modifikation der Standardmethode nach Lowry et al. (40).
Verwendete Lösungen:
Lösung A: 2 % Na_2CO_3, 0,02 % K-Na-Tartrat in dest. H_2O
Lösung B: 0,5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in dest. H_2O
Lösung C: 1 Vol.teil Folin-Ciocalteus-Reagenz und
1 Vol.teil dest. H_2O

0,1 und 0,2 ml der Proteinlösung wurden je mit 0,4 ml 1 N NaOH versetzt, geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden zu den Proben je 4 ml Lösung D, bestehend aus 50 ml Lösung A und 1 ml Lösung B gegeben, gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min wurde

je 0,4 ml Lösung C hinzugefügt und nach einer weiteren Inkubation von 30 min die Extinktion bei 578 nm im Spectralphotometer gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer Eichgeraden mit 1 mg/ml Rinderserumalbumin.

3.1.2. Azocaseintest

Die proteolytische Aktivität von AP und Ela wurde nach Prestidge et al. (64) bestimmt.

Die Testlösung enthielt:
0,1 ml 1 M Tris/HCl, pH 8
0,1 ml dest. Wasser
0,5 ml 2 % Azocaseinlösung in dest. H_2O
0,3 ml Enzymlösung

Inkubation 20 min bei 37°C. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 ml 7 % Perchlorsäure, Zentrifugation bei 4000 U/min 20 min lang (Minifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode). Der Überstand wurde mit 3 ml 10 N NaOH versetzt; Messung der Extinktion bei 430 nm (Beckman, DB, Spectrophotometer).
Die gemessenen Werte wurden auf 1 mg und 1 min Inkubationszeit bezogen und diese Werte als Proteinaseaktivitätseinheiten (PU) definiert.

3.1.3. Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO)

KDO ist ein Bestandteil vonLipopolysaccharid (LPS). Durch die Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure wird KDO aus LPS freigesetzt. Durch Perjodoxidation und Zugabe von Thiobarbitursäure entsteht der Farbstoff von KDO, der dieselbe Absorption wie 2-Desoxyglucose zeigt.

Der KDO-Test wurde nach Osborn (53) durchgeführt. Je 0,2 ml AP und Ela und 0,2 ml der Antikörper gegen AP und Ela wurden mit 0,05 ml 0,1 N H_2SO_4 versetzt und 20 min bei 100°C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurden 0,25 ml HJO_4 (25 mM in 0,125 N H_2SO_4) zugegeben. Dann wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Oxidation wurde mit 0,5 ml $NaAsO_2$ (2 % in 0,5 N HCl) gestoppt. Nach 2 min wurden 2 ml Thiobarbitursäure zugegeben (0,3 % in H_2O, pH 2,0) und 10 min bei 100°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion der Proben bei 546 nm gemessen. Für jeden Test wurde eine Eichkurve mit Desoxyglucoselösungen als Standard in den Konzentrationen 0,625 µg bis 10 µg/0,2 ml verwendet.

Die LPS-Konzentration wurde wie folgt berechnet:
Aus der Eichkurve ergibt sich die in den Proben enthaltene Desoxyglucose- bzw. KDO-Konzentration, da Desoxyglucose KDO entspricht.
Bei einem Molekulargewicht der Desoxyglucose von 164,2 g kann die Anzahl der Mole an KDO pro 200 µl Probe bzw. pro ml Probe berechnet werden.
3 Mole KDO entsprechen 1 Mol LPS; somit läßt sich die LPS-Konzentration über die KDO-Bestimmung durch Division berechnen.
Mit dem bekannten Molekulargewicht für LPS von 3800 g (31) ergibt sich die Konzentration an LPS pro ml und pro mg Probe.
Diese LPS-Konzentration wurde in Prozent, bezogen auf 1 mg Protein (= 100 %), umgerechnet.

3.2. Kultivierung der Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden bis zum Versuchsbeginn in 75 cm^2 Falcon-Gewebekulturflaschen mit 25 ml Wachstumsmedium, bestehend aus MEM_a + 7 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, bei 37°C im Brutschrank gehalten.

Der Zellrasen wurde regelmäßig mikroskopisch auf seine Dichte überprüft (Invertoskop D, Carl Zeiss, Oberkochen).

Bei Dichte des Zellrasens wurden die Zellen 1:2 in zwei neue 75 cm^2-Flaschen wie folgt umgepflanzt:
Das alte Medium wurde mit der Pipette abgesogen. 1/6 des Volumens an PBS, das 0,25 % Trypsin enthielt, wurde vorsichtig auf den Zellrasen geschwenkt, um tote Zellen abzulösen. Das PBS-Trypsin wurde entfernt und 8 ml frisches PBS-Trypsin zugegeben, so daß der Zellrasen gerade bedeckt war, und 10 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Fibroblasten wurden unter Nachschwenken von 5 ml MEM-Medium in 50 ml Falcon Konisch-Röhrchen überführt und 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert (Runne, Heidelberg).
Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden jeweils in 10 ml MEM aufgenommen und zu je 5 ml in zwei neue 75 cm^2 Gewebekulturflaschen überführt, die 20 ml Wachstumsmedium enthielten.Dann wurde bei 37°C bis zur Dichte des Zellrasens inkubiert und erneut 1:2 umgepflanzt.

Da die Versuche in kleinen 25 cm^2 Falcon-Gewebekulturflaschen durchgeführt wurden, wurden die Fibroblasten für den Versuch von einer 75 cm^2-Flasche 1:4 in 25 cm^2-Flaschen umgepflanzt wie beschrieben.
Die 25 cm^2-Flaschen enthielten insgesamt 7 ml Volumen, 4,5 ml Medium und 2,5 ml Zellen.

Beim letzten Umpflanzen wurde der Zelltiter bestimmt, indem ein Aliquot der abzentrifugierten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurde.

3.2.1. Bestimmung der Zellvitalität

Tote Zellen wurden mit Trypanblau identifiziert. Tote Zellen sind im Gegensatz zu lebenden Zellen nicht mehr in der Lage, Trypanblau aus der Zelle auszuschleusen, und färben sich daher blau an (59).

Es wurde eine 1 % Trypanblau-Stammlösung in dest. Wasser hergestellt, die 1:5 mit 0,9 % isotonischer NaCl-Lösung verdünnt wurde.

Zu einem bestimmten Zellvolumen wurde 1/5 an Trypanblaulösung zugegeben. Dann wurde 5 min bei 37°C inkubiert und die toten Zellen wurden mikroskopisch ausgezählt.

3.3. Gewinnung von menschlichen Lymphozyten und Granulozyten

Die Zellen wurden nach der Methode von Bøyum (4) isoliert. Etwa 60 ml peripher-venöses Blut aus einem gesunden Laborspender wurde in 10 ml-EDTA-Röhrchen gesammelt und mit einem Drittel des Blutvolumens an Dextran 500 (5 % w/v in 0,9 % NaCl) versetzt, um die Erythrozyten zu entfernen.

Nach 1 h bei Raumtemperatur in senkrecht stehenden 50 ml-Spritzen hatten sich die Erythrozyten abgesetzt.
Das Serum wurde entnommen und vorsichtig auf einen Ficoll-Isopaque-Gradienten (Lymphoprep) in 50 ml Konisch-Röhrchen geschichtet.

Nach 30 min Zentrifugation bei 2000 U/min und 20°C (Minifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode) bildeten sich zwei Fraktionen aus:
Eine obere, helle Interphase-Fraktion mit mononukleären Zellen und eine Bodenfraktion mit Granulozyten und verbliebene Erythrozyten.

Die mononukleären Zellen wurden vorsichtig abgehebert, dreimal mit HBSS gewaschen und in RPMI-1640_a-Medium aufgenommen. Die Bodenfraktion mit Granulozyten und Erythrozyten wurde mit ca. 5 ml 0,2 % NaCl versetzt, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach 20 sec bei Raumtemperatur wurde dasselbe Volumen 1,8 % NaCl zugegeben, um wieder Isotonie herzustellen, 20 ml HBSS zugegeben und gewaschen. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis alle Erythrozyten lysiert waren und das Pellet weiß war. Das Pellet wurde dann ebenso in RPMI-1640_a aufgenommen.

Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer bestimmt und jeweils auf einen Titer von 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Der Anteil der lebenden Zellen wurde mit dem Trypanblautest (3.2.1.) bestimmt und betrug 95 - 100 %.
Die mononukleären Zellen bestanden zu 90 % aus Lymphozyten und zu 10 % aus Monozyten.

3.4. Präparation der Mausmilzzellen

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde steril entnommen, im Glaspotter in MEM-Medium homogenisiert und durch sterile Watte filtriert. Die Zellen wurden zweimal in MEM gewaschen. Restliche Erythrozyten wurden durch Zugabe von 0,6 % Essigsäure lysiert. Lebende Milzzellen wurden nach Zugabe einer FDA-Färbelösung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Der Zelltiter wurde dann mit RPMI-1640_b + 3,3 % hitzeinaktiviertes Kälberserum auf $4,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.5. Wirkung von AP und Ela auf Fibroblasten

Es sollte untersucht werden, ob die Proteasen einen cytopathischen Effekt auf Lungenfibroblasten ausüben.

Die Versuche wurden in 25 cm^2-Gewebekulturflaschen durchgeführt. Der Titer beim letzten Umpflanzen betrug 2×10^5 Zellen/ml.

Der Versuch wurde folgendermaßen durchgeführt:
Das MEM_a-Wachstumsmedium wurde abgesogen und die Zellen wurden mit PBS gespült. Das PBS wurde entfernt, und es wurden folgende Enzymkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 3 ml PBS zugegeben: 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml und 6,25 µg/ml AP und Ela; außerdem je 50 µg/ml hitzeinaktiviertes Enzym. Zum Vergleich der proteolytischen Aktivität dienten 50 µg/ml Trypsin und 2,5 mg/ml Trypsin (PBS-Trypsin).
Als Kontrolle dienten Fibroblasten in PBS und MEM_a.
Die spezifische Aktivität der AP, bestimmt mit dem Azocaseintest, lag zwischen 0,6 und 1,o PU/mg/min; die der Ela lag zwischen 7,5 und 13 PU/mg/min.

Zu definierten Zeiten (5, 15, 30, 45 min bzw. 1 h, 2 h, 3 h usw. nach Enzymzugabe) wurden die Zellen mikroskopisch (Invertoskop D, Fa. Zeiss, Oberkochen) auf ihre Morphologie untersucht. Außerdem wurde ein kleines Volumen von 15 µl steril entnommen, mit Trypanblau angefärbt wie beschrieben und ausgezählt. Die Anzahl der toten Zellen wurde in Prozent angegeben. Nach 24 h wurden die mit den nativen Enzymen inkubierten Fibroblasten steril in 50 ml-Konisch-Röhrchen überführt, bei 2000 U/min abzentrifugiert, zweimal mit MEM_a gewaschen und in MEM_a + 7 % hitzeinaktiviertes Kälberserum aufgenommen. Dann wurden sie 24 h bei 37°C in frischen Gewebekulturflaschen inkubiert und danach erneut morphologisch beurteilt. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt.

3.6. Adhärenz von AP und Ela an Lymphozyten, Granulozyten und an Mausmilzzellen

Die Adhärenz wurde anhand eines Radioimmunoassays bestimmt. Prinzip des Versuchs war es, nach Inkubation der Zellen mit den Enzymen, die an der Zelloberfläche haftenden Enzyme an mit Kaninchen-IgG gegen AP und Ela beschichtete PVC-U-Platten zu binden und anhand einer Enzym-Standardkurve den Anteil der gebundenen Proteasen zu bestimmen.

Die Platten für den RIA wurden nach Döring et al. (12) vorbereitet. Die Proteinkonzentration der AP variierte von 0,88 bis 1,25 mg/ml, die spezifische Aktivität betrug jeweils 0,7 PU/mg/min. Die Proteinkonzentration der Ela variierte von 0,2 bis 0,37 mg/ml mit einer spezifischen Aktivität von 2,0 PU/mg/min.

Für die Standardkurve wurden die Proteasen in einer 1:10 Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} in RPMI-1640 verdünnt.

Der Titer der Lymphozyten und Granulozyten betrug je 6×10^6 Zellen/ml, der der Mausmilzzellen $4{,}2 \times 10^6$ Zellen/ml.

Es wurden pro Zellart drei Inkubationsansätze mit AP bzw. Ela gemacht:
Je 900 µl der Zellen wurden mit je 100 µl Protease und deren Verdünnungen (Endverdünnung 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) versetzt.

Die Inkubation erfolgte in Plastik-Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) für 1 h bei 37°C unter wiederholtem leichtem Schütteln der Ansätze.

Außerdem wurden die Zellen mit den hitzeinaktivierten Proteasen, Endverdünnung 10^{-1}, und mit RPMI-1640 als Kontrolle inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Lymphozyten, Granulozyten und Mausmilzzellen bei 2000 U/min abzentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal gewaschen, um nicht gebundene Proteasen zu entfernen, und anschließend im Ursprungsvolumen von 1 ml aufgenommen.
Die Vitalität der Zellen wurde vor und nach Inkubation mit dem Trypanblautest (3.2.1.) bestimmt.
Die Inkubationsansätze mit den Proteasen wurden für den RIA jeweils bis Endkonzentration 10^{-4} weiterverdünnt.
Von den Proben bzw. Standardverdünnungen wurden je zweimal 100 µl auf die RIA-Platten aufgetragen.
Nach 12 h Inkubation bei 4°C wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen; anschließend wurde die Radioaktivität jedes Näpfchens mit dem Gamma-Counter gemessen.
Pro Inkubationsansatz wurde eine Titrationskurve erstellt.

Die Titrationskurven für AP und Ela wurden erhalten, indem die gebundene Radioaktivität (cpm) im linearen Maßstab auf der Ordinate und die Verdünnungen von AP und Ela im logarithmischen Maßstab auf der Abszisse aufgetragen wurden.

Parallele Anteile der Titrationskurven der an die Zellen gebundenen Proteasen zur Standardkurve wurden verglichen.

Die Berechnung des Anteils an gebundener Protease erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Enzymkonzentration (mg)}}{X} = \frac{\text{Enzymverdünnung (ml)}}{1\ \text{(ml)}}$$

Der Anteil der gebundenen Protease wurde in Prozent umgerechnet.

3.7. Cytotoxizität gegenüber Lymphozyten und Granulozyten

Es sollte untersucht werden, ob AP und Ela einen cytotoxischen Effekt auf menschliche Lymphozyten und Granulozyten haben.

Die Inkubationsansätze entsprachen denen aus 3.6. Lymphozyten und Granulozyten, Titer 6 x 10^6 Zellen/ml, wurden in einem Volumen von 1 ml (900 µl Zellen und 100 µl AP bzw. Ela) mit den Proteasen (Endkonzentration 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-2} x 1.25 mg/ml AP; 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} x 0,370 mg/ml Ela) inkubiert; ebenso mit den hitzeinaktivierten Proteasen und mit RPMI-1640 als Kontrolle.
Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C unter wiederholtem leichten Schütteln der Ansätze.

Nach Inkubation wurden den Ansätzen jeweils 60 µl entnommen und in Mikrotiterplatten (Falcon 24er Multiwell, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) pipettiert.
Es wurden je 30 µl Kaninchen-Antikörper gegen AP und Ela (1:10 in PBS; Proteinkonzentration anti-AP-IgG 5,2 mg/ml und anti-Ela-IgG 5,4 mg/ml) und 30 µl Kaninchen-Komplement (1:8 in PBS) zugegeben.

Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Zellvitalität mit Trypanblau (3.2.1.) untersucht.

Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, wobei die Komplementkonzentration auf 1:4 bis 1:1 in PBS und die Proteasenkonzentration auf das Dreifache erhöht wurde.

3.8. Stimulationsversuche mit Mausmilzzellen

Es sollte untersucht werden, ob AP und Ela C_3H/HeJ-Mausmilzzellen stimulieren können.

Die Proteasen, nativ und hitzeinaktiviert, und Con A (0,5 mg/ml) wurden in Falcon 2054-Röhrchen (12 x 75 mm, klar, mit Kappe) in einer 1:2 Verdünnungsreihe mit MEM-Medium verdünnt.
Die Proteinkonzentration der AP betrug 0,88 mg/ml, spezifische Aktivität 0,70 PU/mg/min, die der Ela 0,35 mg/ml, spezifische Aktivität 2,64 PU/mg/min, und 0,2 mg/ml, spezifische Aktivität 2,08 PU/mg/min.
Die Versuche wurden in Falcon-Mikrotiterplatten mit U-Boden in Doppelansätzen durchgeführt.
Zu 133 µl einer Milzzellsuspension (Endkonzentration 3,3 x 10^6 Zellen/ml) wurden je 50 µl AP und Ela und deren Verdünnungsreihen gegeben.
Als positive Kontrolle diente Con A, von dem und dessen Verdünnungen ebenfalls 50 µl zu 133 µl Milzzellen gegeben wurden.
Als negative Kontrolle dienten Zellen in MEM.

Nach 24 h Inkubation bei 37°C in einem CO_2-Brutschrank bei 95°C Luftfeuchtigkeit wurden jeweils 25 µl einer ^3H-Thymidinlösung (spezifische Aktivität 5 mCi/mmol) zupipettiert.

Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen entweder bei -20°C eingefroren oder sofort mit dem Mash 1I Sample Harvester auf Glasfiberfilter geerntet.
Die Filter wurden 2 h bei 120°C getrocknet. Nach Zugabe von 6 ml Szintillationsflüssigkeit wurde der ^3H-Thymidineinbau mit dem Szintillationszähler (Betaszint 5000, Berthold, Wildbad) bestimmt.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob Polymyxin B die Stimulation von AP und Ela hemmen kann.

Die Isolierung der Milzzellen erfolgte wie beschrieben (3.4.).
Ein Teil der Zellen wurde mit Polymyxin B auf eine Endkonzentration von 2 µg Polymyxin B/133 µl Zellen eingestellt.

Dieser und der andere Teil der Zellen ohne Polymyxin B wurden mit AP, Ela und Con A stimuliert wie unter 3.8. Als negative Kontrolle dienten Milzzellen in MEM und Zellen in MEM mit Polymyxin B.

Ein anderer Versuch sollte zeigen, ob Antikörper gegen AP und Ela die Stimulation der Mausmilzzellen reduzieren können.
Es wurden Kaninchen-Antikörper verwendet, die nach Döring et al. (12) isoliert worden waren.
Die Proteinkonzentrationen betrugen: AP 0,20 mg/ml; Ela 0,46 mg/ml; anti-AP-IgG 5,4 mg/ml und anti-Ela-IgG 5,7 mg/ml.

Die Antikörper wurden in 100-fachem Überschuß (Konz.) eingesetzt.
Es wurden pro Enzym drei Ansätze gemacht:

1) 35 µl Ela + 350 µl anti-Ela-IgG
2) 35 µl Ela + 350 µl MEM
3) 35 µl MEM + 350 µl anti-Ela-IgG

4) 80 µl AP + 280 µl anti-AP-IgG
5) 80 µl AP + 280 µl MEM
6) 80 µl MEM + 280 µl anti-AP-IgG

Diese Ansätze wurden in einer 1:2 Verdünnungsreihe mit MEM verdünnt.

133 µl der Mausmilzzellen wurden mit je 50 µl dieser Ansätze und deren Verdünnungen inkubiert wie unter 3.8. beschrieben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Wirkung von AP und Ela auf Fibroblasten

Die mit den beiden Proteasen AP und Ela inkubierten Fibroblasten zeigten nacheinander folgende Veränderungen:

1. Die Zellkontakte unter den Zellen lösten sich
2. Die Zellen rundeten sich ab
3. Die Zellen lösten sich vom Boden ab

Diese drei Effekte, die sich mikroskopisch leicht beobachten ließen, wurden als cytopathischer Effekt (CE) bezeichnet. Der cytopathische Effekt war mit der Ablösung der Zellen beendet.

Anschließend setzte ein letaler Effekt (LE) ein. Mikroskopisch zeigte sich folgendes:

4. Mit fortschreitender Inkubation mit den Proteasen klebten die Zellen in riesigen Zellhaufen aus Hunderten von Zellen zusammen.
5. Langsam setzte bei einem Teil der Zellen eine Lyse ein, so daß die Zellen als leere "Ghosts" imponierten.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen die Effekte der Proteasen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Abbildung 1 demonstriert den cytopathischen Effekt der AP. Ein 100 %iger cytopathischer Effekt war bei einer Enzymkonzentration von 50 µg/ml nach 90 Minuten, bei 25 µg/ml nach 120 Minuten, bei 12,5 µg/ml nach 170 und bei 6,25 µg/ml nach 240 Minuten nachweisbar.

Abbildung 2 zeigt den cytopathischen Effekt der Ela. Ein 100 %iger cytopathischer Effekt war bei 50 µg/ml nach 30 Minuten, bei 25 µg/ml nach 45 Minuten, bei 12,5 µg/ml nach 60 und bei 6,25 µg/ml nach 90 Minuten nachweisbar.

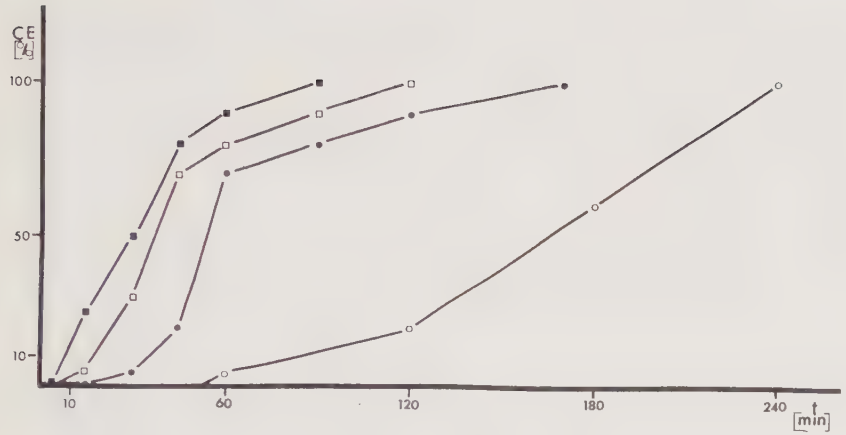


Abb. 1: Zeitabhängiger cytopathischer Effekt (CE) der AP gegenüber menschlichen Fibroblasten

-■- 50 µg/ml AP -●- 12,5 µg/ml AP
-□- 25 µg/ml AP -o- 6,25 µg/ml AP

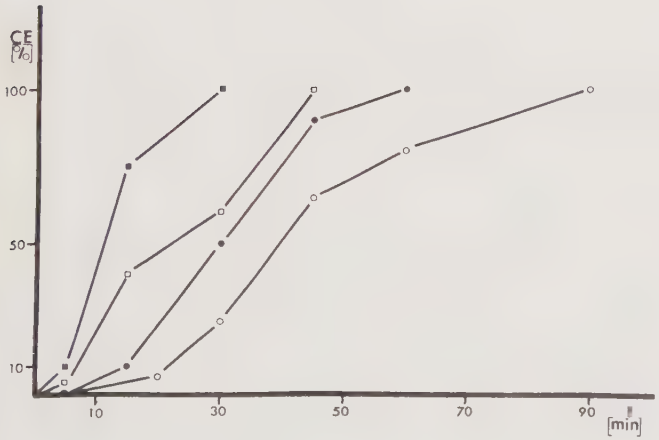


Abb. 2: Zeitabhängiger cytopathischer Effekt (CE) der Ela gegenüber menschlichen Fibroblasten

-■- 50 µg/ml Ela -●- 12,5 µg/ml Ela
-□- 25 µg/ml Ela -o- 6,25 µg/ml Ela

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, daß der cytopathische Effekt von der Enzymkonzentration und von der Inkubationszeit abhängig ist.
Deutliche morphologische Veränderungen, die Abrundung und Ablösung der Zellen, zeigten sich bei AP und Ela bereits nach 10 Minuten.

Beide hitzeinaktivierten Proteasen hatten keine Wirkung auf die Fibroblasten. Der cytopathische Effekt wird also über die proteolytische Wirkung vermittelt.

Der Vergleich von AP und Ela zeigt, daß der cytopathische Effekt der Ela auf die Fiborblasten in einem Drittel der Inkubationszeit erreicht wird.

Keine Wirkung auf die Fibroblasten hatte 50 µg/ml Trypsin, das als Vergleich zu den Proteasen diente.
PBS-Trypsin, Konzentration 2,5 mg/ml, das zum Umpflanzen der Zellen verwendet wird, führte innerhalb von 5 Minuten zu einer 100 %igen Ablösung der Zellen. Diese wuchsen aber im Gegensatz zu den mit AP und Ela inkubierten Zellen innerhalb kurzer Zeit schon wieder an. Nach 7 Stunden in PBS-Trypsin waren bereits 60 % und nach 12 Stunden 90 % der Fibroblasten wieder angewachsen.

Mit fortschreitender Inkubation mit AP und Ela trat ein letaler Effekt auf.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen den letalen Effekt von AP und Ela in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

50 µg/ml der AP führten zu 40 %, 25 µg/ml zu 30 %, 12,5 µg/ml zu 25 % und 6,25 µg/ml zu 20 % Letalität innerhalb von 12 Stunden.
50, 25 und 12,5 µg/ml der Ela führten innerhalb von 12 Stunden jeweils zu 40 % Letalität, wobei diese von 50 µg/ml bereits nach 9 Stunden erreicht wurde. 6,25 µg/ml führten zu 25 % Letalität in 12 Stunden.

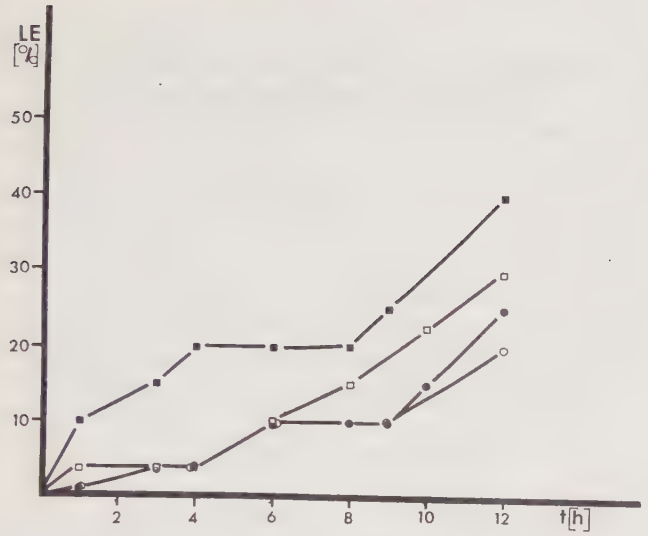


Abb. 3: Zeitabhängiger letaler Effekt (LE) der AP gegenüber menschlichen Fibroblasten
-■- 50 µg/ml AP -●- 12,5 µg/ml AP
-□- 25 µg/ml AP -o- 6,25 µg/ml AP

Nach 6 Stunden Inkubation setzte bei beiden Proteasen in der höchsten Konzentration von 50 µg/ml langsam eine Lyse der Zellen ein, die nach 24 Stunden 80 bis 90 % erreichte.

Die Lyse war bei den niedrigeren Konzentrationen der Ela weniger ausgeprägt und betrug 10 bis 20 %.
Die AP führte nach 24 Stunden Inkubation zu einer 80 bis 90 %igen Lyse der Zellen bei allen Konzentrationen. Nach 48 Stunden waren nur noch Zelltrümmer vorhanden.

Anzumerken ist, daß sich die lysierten Zellen mit Trypanblau nicht mehr anfärbten, so daß die Gesamtletalität bei fortgeschrittener Inkubationsdauer nicht mehr exakt zu bestimmen war. Aus diesem Grunde wurde der maximale letale Effekt der Proteasen nach 12 Stunden bestimmt.

Die nach 24 Stunden gewaschenen und in frisches Medium

überführten Zellen wuchsen jeweils zu 99 % nicht mehr an. Der Trypanblautest der nicht lysierten Zellen zeigte, daß auch diese Zellen tot waren.

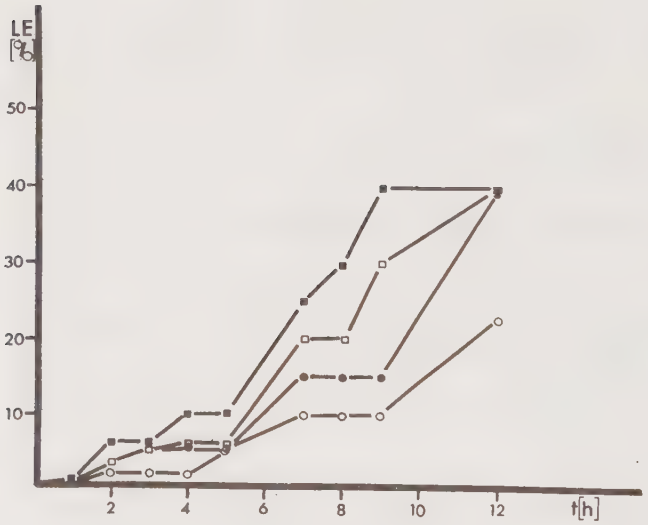


Abb. 4: Zeitabhängiger letaler Effekt (LE) der Ela gegenüber menschlichen Fibroblasten

-■- 50 µg/ml Ela
-□- 25 µg/ml Ela
-●- 12,5 µg/ml Ela
-o- 6,25 µg/ml Ela

4.2. Adhärenz von AP und Ela an Lymphozyten, Granulozyten und an Mausmilzzellen

Der Anteil der an die Zellen gebundenen Proteasen wurde nach Döring et al. (12) mit einem Radioimmunoassay bestimmt.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch die graphische Darstellung eines Radioimmunoassay mit AP.
Die übrigen Versuche wurden analog dargestellt, um den Anteil der gebundenen Proteasen zu ermitteln.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Adhärenz.

Tabelle 1: Anteil der gebundenen Enzyme AP und Ela an Lymphozyten, Granulozyten und Mausmilzzellen in Prozent

	Lymphozyten	Granulozyten	Milzzellen
AP	2,4 % 2,5 %	2,2 % 0,7 %	0,2 %
Ela	3,0 % 4,5 %	2,3 % 2,2 %	0,31 %

Der Anteil der gebundenen hitzeinaktivierten Enzyme betrug weniger als 0,1 % (0,005, 0,02, 0,001).

Die Ergebnisse zeigen eine etwas unterschiedliche Bindung der Proteasen an die verschiedenen Zellen. Diese Bindung stellt allerdings den Bruchteil einer Enzymkinetik dar und ist daher als ein dynamischer Prozeß und nicht als ein fixer Wert zu betrachten.

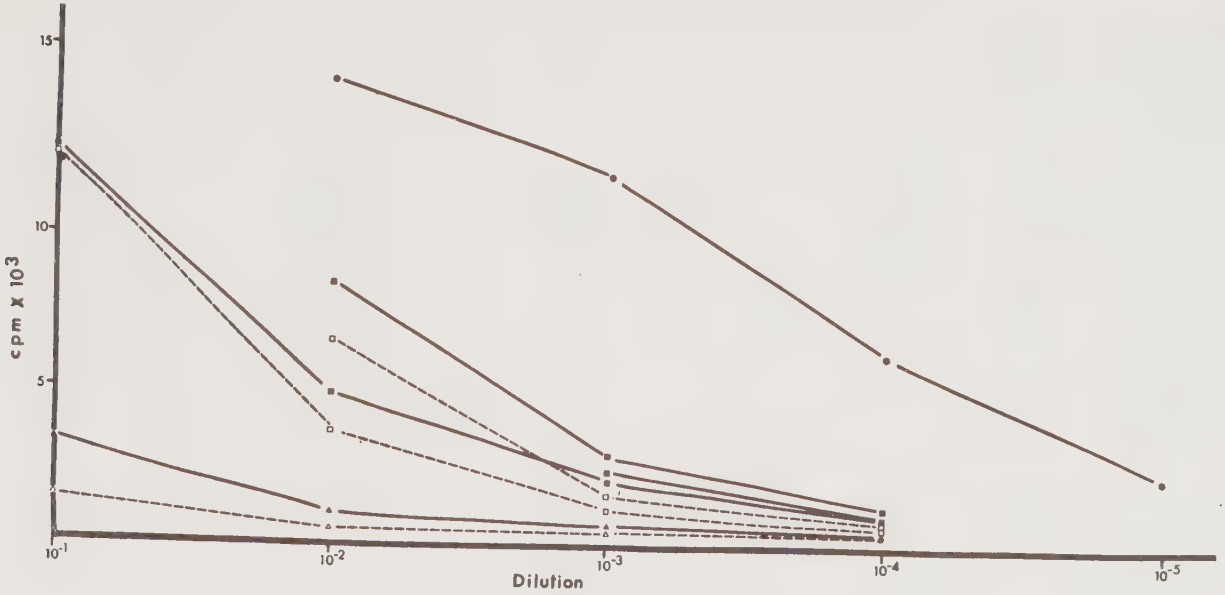


Abb. 5 RIA: Bindung von AP an Lymphozyten und Granulozyten;
900 µl Zellen wurden jeweils mit 100 µl AP (Endkonzentration 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} x 0,88 mg/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert.

-●- AP-Standardkurve
-■- Lymphozyten + AP
--□-- Granulozyten + AP
—▲— Lymphozyten + hitzeinaktivierte AP
--△-- Granulozyten + hitzeinaktivierte AP

4.3. Cytotoxizität gegenüber Lymphozyten und Granulozyten

AP (Endkonzentration 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} x 1,25 mg/ml) und Ela (Endkonzentration 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} x 0,370 mg/ml) übten keinen cytotoxischen Effekt auf menschliche Lymphozyten und Granulozyten aus. Es fand keine Lyse der Zellen statt; der Trypanblautest zeigte 0 - 1 % tote Zellen an, was der Kontrolle entsprach.
Erhöhung der Komplement- und der Proteasenkonzentration änderten das Ergebnis nicht.

4.4. Stimulationsversuche mit Mausmilzzellen

Tabelle 2 und Abbildung 6, Exp. 1 - 4, zeigen die Ergebnisse der Stimulation von C_3H/HeJ-Milzzellen mit AP.

Das Maximum der Stimulation mit nativer AP lag in Experiment 1 bei einer Enzymkonzentration von 5,5 µg AP pro Zellkultur, in Experiment 2, 3 und 4 bei einer Konzentration von 2,8 µg AP pro Kultur.
Die Maxima der vier Versuche waren somit 3, 9, 4 und 26 mal so hoch wie die jeweilige Kontrolle ohne Mitogen.

Das Maximum der Stimulation mit hitzeinaktivierter AP lag in Experiment 1 bei 2,8 µg, in Experiment 2 und 3 bei 5,5 µg und in Experiment 4 bei 11 µg AP pro Kultur.
Die Stimulationsmaxima waren somit 5, 4, 3 und 6 mal so hoch wie die entsprechenden Kontrollen.

Die höchste AP-Konzentration von 44 µg pro Kultur ergab weder beim nativen noch beim hitzeinaktivierten Enzym eine signifikante Stimulation; die niedrigste AP-Konzentration von 0,2 µg führte dagegen überwiegend noch zu einer Stimulation der C_3H/HeJ-Milzzellen.

Tabelle 2: Stimulation von C_3H/HeJ-Zellen mit AP (0,88 mg/ml)
AP_H: hitzeinaktiviertes Enzym

Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4	
	AP	AP_H	AP	AP_H	AP	AP_H	AP	AP_H
	cpm		cpm		cpm		cpm	
44	390	93	1744	2094	101	106	1775	3693
22	5273	119	1290	5192	170	253	10408	14254
11	7902	1279	467	5732	859	6352	13723	24508
5,5	9097	9060	2315	5873	14415	17590	10199	16516
2,8	7908	11607	5387	5092	18330	14559	19079	8322
1,4	4755	8282	5077	4345	16789	11568	4343	15751
0,7	3959	7735	5550	2855	12954	10145	7400	8538
0,4	2957	5213	4694	2266	9874	9129	7892	9505
0,2	259	4692	3340	2253	7446	8700	3971	7480
Kontrolle	3003	2475	589	1654	4153	6777	748	3787

Tabelle 3 und Abbildung 7, Exp. 1 - 3, zeigen die Ergebnisse der Stimulation mit Ela.
Die Proteinkonzentration der Ela in Experiment 3 war 1,75 mal niedriger als die in Experiment 1 und 2.

Das Stimulationsmaximum lag in Experiment 1 - 3 bei einer Enzymkonzentration von 0,3, 1,1 und 1,3 µg Ela pro Kultur. Die Maxima der Versuche waren somit 3, 16 und 18 mal so hoch wie die zugehörigen Kontrollen ohne Mitogen.

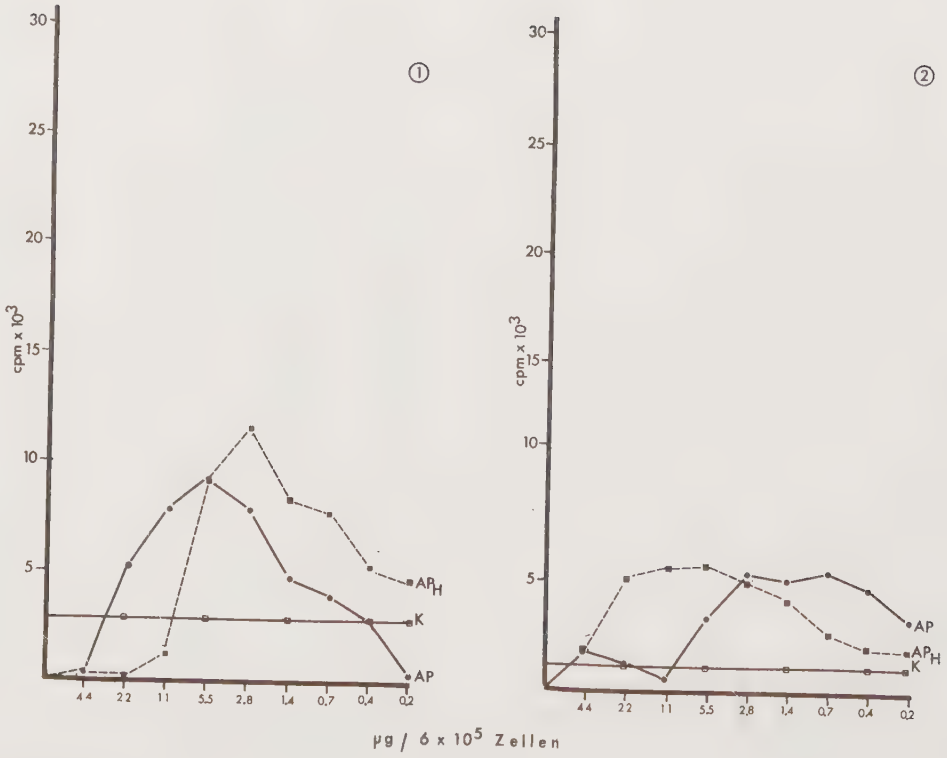
Das Maximum der Stimulation mit hitzeinaktivierter Ela lag in Experiment 1 bei 4,4 µg, in Experiment 2 bei 2,2 µg und in Experiment 3 bei 2,5 µg Ela pro Zellkultur.

Die Stimulationsmaxima waren somit 6, 3 und 11 mal so hoch wie die entsprechenden Kontrollen.

AP und Ela führten somit zu einer deutlichen Stimulation von C_3H/HeJ-Milzzellen; die Maxima der Stimulation lagen mehrfach über der Kontrolle.

Die hitzeinaktivierten Proteasen wiesen bis auf eine Ausnahme - Abbildung 7, Experiment 2 mit Ela - keine Reduktion der Stimulation auf. Bei einigen Versuchen trat eine höhere Stimulation im Vergleich zum nativen Enzym auf. Besonders bei hohen Proteasekonzentrationen führten die hitzeinaktivierten Enzyme in fast allen Experimenten zu einer stärkeren Proliferation der Milzzellen wie die nativen Enzyme.

Abb. 6: Experiment 1 - 4: Stimulation von C_3H-HeJ-Mausmilzzellen ($3{,}3 \times 10^6$ Zellen/ml) mit AP (0,88 mg/ml)
AP_H: hitzeinaktivierte AP
K: Kontrolle (Mittelwert)


①
②
cpm x 10^3
30
25
20
15
10
5
AP$_H$
K
AP
4.4
2.2
1.1
5.5
2.8
1.4
0.7
0.4
0.2
µg / 6 x 10^5 Zellen

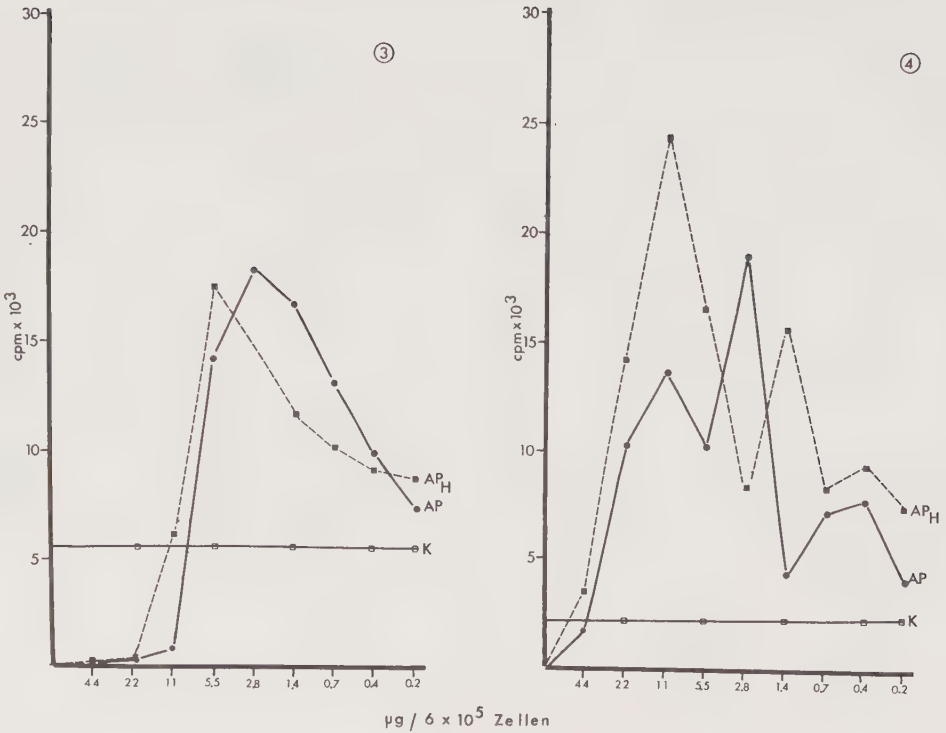

③
④
cpm x 10³
30
25
20
15
10
5
AP_H
AP
K
4.4
2.2
1.1
5.5
2.8
1.4
0.7
0.4
0.2
µg / 6 x 10⁵ Zellen

Tabelle 3: Stimulation von C_3H/HeJ-Zellen mit Ela (0,35 mg/ml und 0,2 mg/ml)
Ela_H: hitzeinaktiviertes Enzym

Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	Exp. 1		Exp. 2		Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	Exp. 3	
	Ela	Ela_H	Ela	Ela_H		Ela	Ela_H
	cpm		cpm			cpm	
17,5	111	92	2641	161	10	3558	6002
8,8	414	820	20253	535	5	12071	31469
4,4	2723	26470	36683	6130	2,5	43285	44116
2,2	7842	25051	37101	8635	1,3	46803	31258
1,1	12473	14165	38501	5263	0,7	18098	10686
0,6	13153	12413	33578	4700	0,4	11682	5789
0,3	13548	9601	30956	3821	0,2	8829	5558
0,2	10713	7873	27108	3142	0,1	7470	5111
0,1	6463	5978	19685	3198	0,05	6428	5430
Kontrolle	4585	4238	2409	2469	Kontrolle	2599	3872

Der Vergleich von AP und Ela zeigt, daß Ela eine größere mitogene Wirkung auf die C_3H/HeJ-Mausmilzzellen hat, da die optimale Konzentration zur Stimulation bei Ela geringer und die Proliferationsrate der Zellen höher ist.

Der KDO-Test, über den der Lipopolysaccharid bestimmt werden kann, hatte einen LPS-Gehalt der AP von 9,7 µg LPS/ml AP bzw. 51 µg LPS/mg AP (= 5 %) und einen LPS-Gehalt der Ela von 4 µg LPS/ml Ela bzw. 11,4 µg LPS/mg Ela (= 1 %) ergeben.

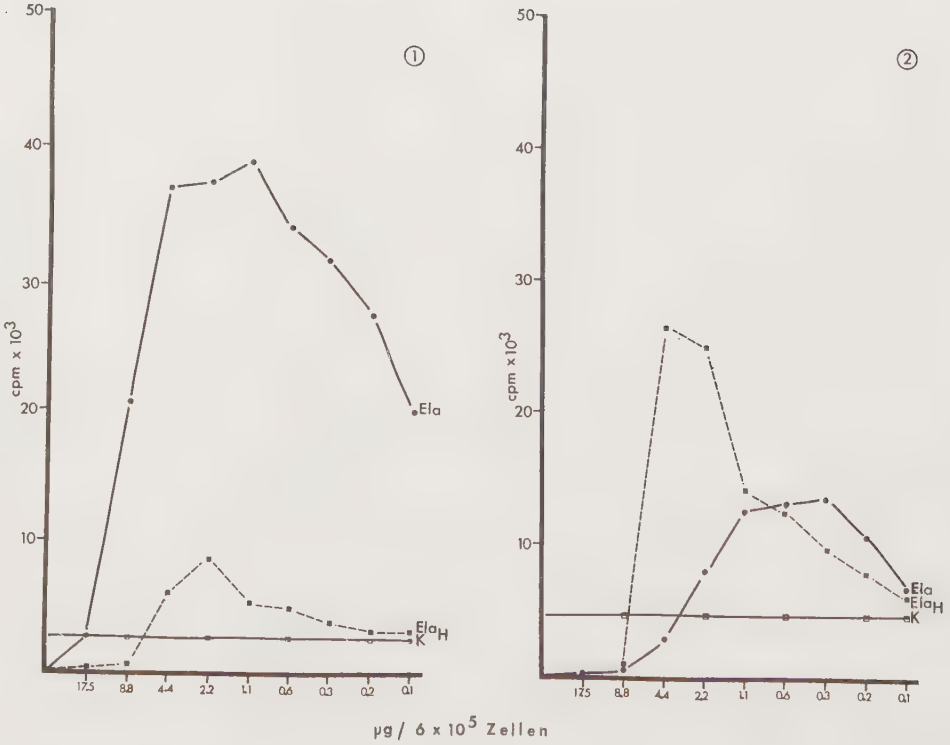
Um einen stimulierenden Effekt von LPS auf die Milzzellen auszuschließen, wurde Polymyxin B verwendet, das LPS spezifisch hemmen kann (45).

Die Hemmung der Stimulation von AP und Ela durch Polymyxin sollte eine Aussage machen über den Anteil von LPS an der Stimulation der Milzzellen.

Die Tabellen 4 und 5 zeigen die Reduktion der Stimulation der C_3H/HeJ-Zellen mit AP durch Polymyxin B.

Die native AP wurde am Stimulationsmaximum von Polymyxin B um 45 % und um 64 % gehemmt. In Experiment 1 betrug die im singifikanten Stimulationsbereich - cpm unterhalb der Kontrolle unberücksichtigt - erzielte Reduktion 3 bis 62 %, in Experiment 2 28 bis 72 %.

Abb. 7: Experiment 1-3: Stimulation von C_3H/HeJ-Mausmilzzellen ($3{,}3 \times 10^6$ Zellen/ml) mit Ela (0,35 mg/ml bzw. 0,1 mg/ml in Experiment 3)
Ela_H: hitzeinaktivierte Ela;
K: Kontrolle (Mittelwert)


①
②
50
40
30
20
10
cpm x 10^3
Ela
Ela_H
K
17.5
8.8
4.4
2.2
1.1
0.6
0.3
0.2
0.1
µg / 6 x 10^5 Zellen

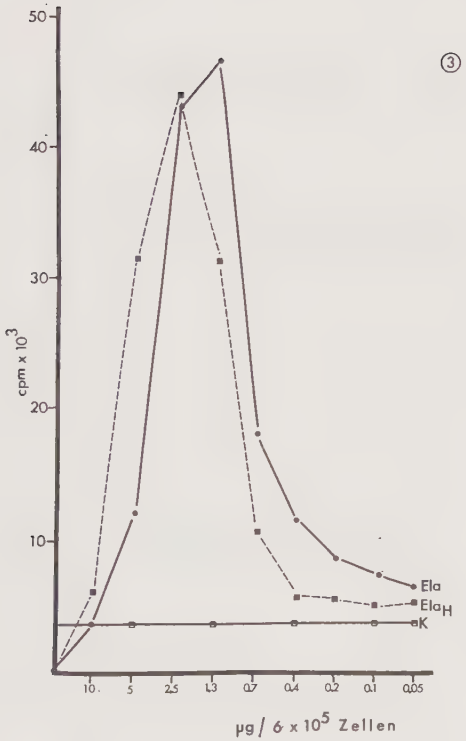

③
50
40
30
20
10
cpm x 10^3
Ela
Ela_H
K
10.
5
2.5
1.3
0.7
0.4
0.2
0.1
0.05
µg / 6 x 10^5 Zellen

Tabelle 4: Hemmung der Stimulation der AP mit Polymyxin B (PB); Experiment 1
AP_H: hitzeinaktiviertes Enzym

Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	AP	AP+PB	% Hemmung	AP_H	AP_H+PB	% Hemmung
	cpm			cpm		
44	390	206	49	93	48	48
22	5273	1480	62	119	110	8
11	7902	4116	48	1279	1006	21
5,5	9097	5031	45	9060	8282	9
2,8	7908	5010	37	11607	8472	27
1,4	4755	4236	11	8282	6456	22
0,7	3959	3826	3	7735	4832	38
0,4	2957	2874	3	5213	3545	32
0,2	259	2662	–	4692	2967	27
Kontrolle	3003	1951	35	2475	2010	19

Tabelle 5: Hemmung der Stimulation der AP mit Polymyxin B (PB); Experiment 2
AP_H: hitzeinaktiviertes Enzym

Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	AP	AP+BP	% Hemmung	AP_H	AP_H+PB	% Hemmung
	cpm			cpm		
44	101	93	8	106	132	-
22	170	964	-	253	2103	-
11	859	3968	-	6352	5430	-
5,5	14415	6359	56	17590	7434	58
2,8	18330	6605	64	14559	5617	61
1,4	16789	4749	72	11508	5653	51
0,7	12954	4078	69	10145	7098	30
0,4	9874	4985	50	9129	7042	23
0,2	7446	5324	28	8700	7154	18
Kontrolle	4153	4338	-	6777	6566	3

Die hitzeinaktivierte AP wurde am Stimulationsmaximum von Polymyxin B um 27 bzw. 58 % gehemmt. Die im signifikanten Stimulationsbereich erzielte Reduktion betrug in Experiment 1 9 bis 38 %, in Experiment 2 18 bis 58 %.

Die jeweiligen Kontrollen mit Polymyxin B ohne Protease ergaben in Experiment 1 eine Hemmung der Stimulation von 35 % und 19 % und in Experiment 2 0 % und 3 %.

Die Tabellen 6 und 7 zeigen die Reduktion der Stimulation der Milzzellen mit Ela durch Polymyxin B.

Am Stimulationsmaximum trat eine Hemmung von 34 bzw. 47 % auf. Die im signifikanten Stimulationsbereich erzielte Reduktion bewegte sich in Experiment 1 zwischen 29 und 62 %, in Experiment 2 zwischen 1 und 47 %.

Die hitzeinaktivierte Elastase wurde am Stimulationsmaximum um 62 bzw. 64 % gehemmt. Die Reduktion bewegte sich in Experiment 1 zwischen 32 und 62 %, in Experiment 2 zwischen 14 und 64 %.
Die jeweiligen Kontrollen mit Polymyxin B allein ergaben in Experiment 1 eine 18 und 22 %ige Hemmung, in Experiment 2 keine und eine 5 %ige Hemmung.

Tabelle 8 zeigt als Vergleich die Stimulation der C_3H/HeJ-Mausmilzzellen mit Con A und die mit Polymyxin B erzielte Hemmung. Im signifikanten Stimulationsbereich von Con A betrug die Hemmung 4 bis 9 %.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, ob die Stimulation durch AP und Ela spezifisch ist und ob somit Antikörper gegen AP und Ela die Stimulation der Milzzellen reduzieren.

Der KDO-Test hatte eine LPS-Kontamination der anti-AP-IgG von 13,5 µg LPS/ml bzw. von 2,5 µg LPS/mg anti-AP-IgG (= 0,2 %) und einen LPS-Gehalt der anti-Ela-IgG von 8,7 µg LPS/ml bzw. von 1,6 µg LPS/mg anti-Ela-IgG ergeben.

Tabelle 6: Hemmung der Stimulation der Ela mit Polymyxin B (PB); Experiment 1
Ela_H: hitzeinaktiviertes Enzym

Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	Ela	Ela+PB	% Hemmung	Ela_H	Ela_H+PB	% Hemmung
	cpm			cpm		
17,5	2641	3849	-	161	106	34
8,8	20253	14423	29	535	5007	-
4,4	36683	23354	32	6130	4141	32
2,2	37101	24593	36	8635	3312	62
1,1	38501	25551	34	5263	2669	49
0,6	33578	21711	35	4700	2118	55
0,3	30956	21415	31	3821	1974	48
0,2	27108	15503	43	3142	1676	47
0,1	19685	7621	62	3198	1700	47
Kontrolle	2409	1985	18	2469	1937	22

Tabelle 7: Hemmung der Stimulation der Ela mit Polymyxin B (PB); Experiment 2
Ela_H: hitzeinaktiviertes Enzym

Enkonzentration µg/6x10^5 Zellen	Ela	Ela+PB	% Hemmung	Ela_H	Ela_H+PB	% Hemmung
	cpm			cpm		
17,5	111	382	-	92	294	-
8,8	414	1161	-	820	6654	-
4,4	2723	4333	-	26470	9405	64
2,2	7842	5702	27	25051	9114	64
1,1	12473	7039	46	14165	8702	38
0,6	13153	7883	40	12413	6054	51
0,3	13548	7189	47	9601	6160	36
0,2	10713	6741	37	7873	5278	23
0,1	6463	6372	1	5978	5141	14
Kontrolle	4585	5304	-	4238	4840	5

Tabelle 8: Hemmung der Stimulation von Con A (0,5 mg/ml) mit Polymyxin B (PB)

Endkonzentration µg/6x10^5 Zellen	Con A	Con A + PB	% Hemmung
	cpm		
25	727	196	74
12,5	849	550	35
6,3	1936	1357	30
3,2	9871	4026	59
1,6	54231	49265	9
0,8	72431	69166	4
0,4	83276	84747	-
0,2	83798	78529	6
0,1	73212	68758	6
Kontrolle	2331	2020	13

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der Hemmung der Stimulation mit AP durch anti-AP-IgG. Eine signifikante Stimulation der Milzzellen mit AP trat in Experiment 1 im Bereich zwischen 0,14 und 1,05 µg AP pro Kultur auf und bewegte sich zwischen 11497 und 32622 cpm.

In diesem Bereich wurde die Stimulation durch anti-AP-IgG vollständig gehemmt. Die Antikörper selbst führten zu keiner Stimulation. In Experiment 2 trat eine signifikante Stimulation (2 mal so hoch wie Kontrolle) mit AP im Bereich zwischen 0,14 und 2,10 µg AP pro Kultur auf. In diesem Bereich führten auch die Antikörper zu einer Stimulation der Zellen, maximal 44978 cpm, und es trat auch keine Reduktion der Stimulation auf.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Hemmung der Stimulation mit Ela durch anti-Ela-IgG.

Tabelle 9: Hemmung der Stimulation von AP durch anti-AP-IgG, Antikörper in 100-fachem Überschuß (AK)

Endkonzentration $\mu g/6x10^5$ Zellen	Experiment 1			Experiment 2		
	AP cpm	AP+AK cpm	AK cpm	AP cpm	AP+AK cpm	AK cpm
2,10	2935	117	105	53641	574	16712
1,05	32622	85	123	33309	36781	44978
0,53	30712	116	109	23180	33608	29036
0,27	15393	174	316	15716	19578	16104
0,14	11497	2366	828	9569	13385	11239
0,07	9603	7882	7211	8565	7625	8224
0,04	8654	8620	8284	7230	6643	5994
0,02	8140	8424	7560	6411	6425	6826
0,01	7926	7101	7076	6630	6101	7162
Kontrolle	6843	7019	7242	5057	6546	6631

Tabelle 10: Hemmung der Stimulation von Ela durch anti-Ela-IgG, Antikörper in 100-fachem Überschuß (AK)

Endkonzentration $\mu g/6x10^5$ Zellen	Experiment 1			Experiment 2		
	Ela cpm	Ela+AK cpm	AK cpm	Ela cpm	Ela+AK cpm	AK cpm
2,10	49515	410	221	51077	770	503
1,05	40932	481	180	51065	1443	4337
0,53	30708	479	196	36075	10155	9262
0,27	17700	622	857	25375	12980	9634
0,14	13612	611	763	16301	10903	6037
0,07	10108	2083	4361	10952	9221	4731
0,04	8765	8010	9238	8350	7834	4251
0,02	8207	7141	8183	8166	7336	5375
0,01	7756	6701	7567	7555	6340	5018
Kontrolle	7929	6941	7583	7204	5671	6282

Eine signifikante Stimulation mit Ela trat in Experiment 1 zwischen 0,14 und 2,10 µg Ela pro Kultur auf und bewegte sich zwischen 13612 und 49515 cpm. Die Antikörper selbst hatten keine stimulierende Wirkung und führten in diesem Bereich zu einer vollständigen Reduktion der Stimulation.

In Experiment 2 lag der signifikante Stimulationsbereich ebenso zwischen 0,14 und 2,10 µg Ela pro Kultur, entsprechend 16301 bis 51077 cpm. Die anti-Ela-IgG wiesen keine signifikante Stimulation auf. Während in den beiden höchsten Konzentrationen der Ela eine vollständige Reduktion der Stimulation auftrat, blieb in den drei folgenden Konzentrationen noch eine erhebliche mitogene Wirkung der Ela bestehen, 10155, 12980 und 10903 cpm; dies entsprach einer Reduktion von 62 %, 49 % und 33 %.

Die Antikörper gegen AP und Ela führten zu einer Hemmung der Stimulation der Mausmilzzellen. Somit findet also eine spezifische Wirkung von AP und Ela auf die C_3H/HeJ-Milzzellen statt.

5. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß AP und Ela im Konzentrationsbereich zwischen 6,25 und 50 µg/ml einen zeit- und konzentrationsabhängigen cytopathischen und letalen Effekt auf Lungenfibroblasten ausüben; die Wirkung der Ela ist dabei im Vergleich zur AP stärker, das heißt, der cytopathische Effekt tritt schneller auf und die letale Wirkung ist größer.

Trypsin, das als Vergleich zu den Proteasen diente, übt trotz 50-fach höherer Konzentration (2,5 mg/ml) lediglich einen cytopathischen Effekt auf die Fibroblasten aus, der zudem reversibel ist. Die proteolytische Aktivität von AP und Ela ist daher um das Vielfache größer.

Obwohl die durch AP und Ela verursachten mikroskopischen Veränderungen der Fibroblasten, die den cytopathischen Effekt definieren, gleich sind, heißt das nicht, daß die beiden Proteasen denselben Angriffspunkt haben. Die proteolytische Abspaltung verschiedener Zellbestandteile könnte zum selben mikroskopisch beobachtbaren Ergebnis führen.

Aufgrund ihrer Wirkung auf Fibroblasten können AP und Ela als Cytolysine bezeichnet werden.
Cytolysine werden als Substanzen charakterisiert, die Säugetier- oder andere Zellen in vitro physikalisch zerstören können (76). Ihr cytolytischer Effekt basiert auf ihrer Membran-zerstörenden Aktivität, die auf einer direkten Interaktion zwischen Cytolysin und der Plasmamembran sensitiver Zellen beruht (2).
Diese Interaktion verändert die chemische und/oder strukturelle Konfiguration der Zellmembran und führt so zu Veränderungen der Zellpermeabilität und schließlich zur Lyse der Zelle (76).

Lungenfibroblasten sollen neben phagozytierenden Zellen, Immunglobulinen, dem Komplementsystem und dem mukociliären Transportsystem (57) durch die Verdauung von Enzymen und anderen Substanzen ein sekundäres Schutzschild der Lunge bilden (5). Die Synthese von Enzymen wie Superoxid-Dismutase und Plasminogen-Aktivator soll zum Schutz der Alveolarstruktur beitragen (5). In der adulten Lunge nehmen Fibroblasten 75 % des Gesamtinterstitiums ein. Ihre wesentliche Aufgabe besteht in der Produktion von Kollagen, Proteoglykanen und Fibronektin (5), einem Glykoprotein an der Zelloberfläche (29).

Fibronektin, das vor der Besiedlung gramnegativer Bakterien schützt (85), ist Protease-sensitiv (29). Die mögliche Abspaltung von Fibronektin durch AP und Ela in geringer Konzentration könnte die bakterielle Besiedlung der Lunge beschleunigen.
Nicas und Iglewski (48) wiesen zwar nach, daß auch ohne Ela, Exotoxin A und Exoenzym S eine bakterielle Besiedlung der Lunge stattfindet, hatten aber die AP nicht mitgetestet.

Döring et al. (15) konnten AP und Ela in vivo im Nanogrammbereich nachweisen. Es ist aber denkbar, daß lokal viel höhere Proteasekonzentrationen erreicht werden.

Fibroblasten sind auch fähig, in vitro und in vivo zu wandern, und sie versammeln sich daherzusammen mit anderen Zellen an Orten, an denen entzündliche Prozesse ablaufen (65). Histologische Untersuchungen von Tieren, die experimentell mit P. aeruginosa infiziert worden waren, zeigten Fibroblasten sowohl im Zentrum der Nekrosen (77), als auch als Bestandteil des Granulationsgewebes (54). Die Zerstörung der Lungenfibroblasten durch AP und Ela ist daher wahrscheinlich von Bedeutung bei der Bildung irreversibler Nekrosen der Lunge.

Mit einem Radioimmunoassay wurde eine Bindung von nativer AP und Ela an Granulozyten (0,7 bis 2,3 %), Lymphozyten (2,4 bis 4,5 %) und an Mausmilzzellen (0,2 und 0,31 %) nachgewiesen. Die Bindung der hitzeinaktivierten Proteasen betrug weniger als 0,1 %.
Diese Bindung ist der Ausdruck einer Enzymkinetik und ist daher nicht als feststehender Wert, sondern als ein dynamischer Prozeß zu betrachten.
Die Proteasen werden dabei nicht an einen Rezeptor gebunden, sondern nehmen nur kurzen Kontakt mit den Zellen auf.

Granulozyten spielen durch ihre phagozytierende Tätigkeit eine wichtige Rolle in der Immunabwehr (6, 7), klinisch sichtbar durch die Verknüpfung von Granulozytopenie mit P. aeruginosa-Infektionen (68).
Der Effekt von AP und Ela auf Granulozyten und Lymphozyten wurde daher untersucht.
Es konnte mit dem Trypanblautest keine mikroskopisch sichtbare cytotoxische Wirkung von AP, höchste Endkonzentration 125 µg/ml, und Ela, höchste Endkonzentration 37 µg/ml, auf menschliche Lymphozyten und Granulozyten nachgewiesen werden. Die Vitalität der Zellen wurde durch die beiden Proteasen nicht beeinträchtigt.
Weber et al. (83) konnten ebenfalls keinen Effekt der Proteasen auf Granulozyten und auf deren Phagozytosefähigkeit feststellen, im Gegensatz zu anderen Autoren (86).
Kharazmi et al. (37, 38) konnten allerdings zeigen, daß trotz morphologischer Intaktheit der Granulozyten nach Inkubation mit AP und Ela Chemotaxis und Chemolumineszenz reduziert waren.
Es ist daher möglich, daß trotz Vitalität verschiedene Funktionen der Granulozyten und auch der Lymphozyten beeinträchtigt sind.

Es konnte bisher nachgewiesen werden, daß P. aeruginosa und seine verschiedenen Produkte wie Exoenzyme und Pigmente Mausmilzzellen (26, 51), B- oder T-Lymphozyten stimulieren

(8, 18, 63) oder supprimieren (30, 73) können.
Eine mitogene Wirkung von Proteasen auf Lymphozyten und Mausmilzzellen ist bekannt, und es wurde vermutet, daß Proteasen als Immunostimulantien wirken können (19, 78, 79).

Die Ergebnisse zeigen nun, daß AP und Ela zur Stimulation von C_3H/HeJ-Milzzellen führen.
Hitzeinaktivierung der Proteasen führt zu keiner Reduktion der Stimulation, sondern teilweise zu einer höheren Proliferationsrate der Zellen.
Dies bedeutet, daß die Stimulation der Milzzellen nicht über die proteolytische Wirkung der Enzyme stattfindet, sondern über eine nichtenzymatische strukturelle Komponente.
Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Meinung, daß ein proteolytischer Effekt bei der Aktivierung von Lymphozyten eine Rolle spielt und daß Proteasen unspezifisch durch ihre proteolytische Wirkung zur Stimulation führen (19, 74).
Eine Stimulation nach Hitzeinaktivierung wurde auch bei Alpha- und Gamma-Toxin von Staphylococcus aureus nachgewiesen, und es wurde vermutet, daß die Stimulation auf einer Struktur beruht, die unabhängig ist von der für die enzymatische Aktivität erforderlichen Struktur (58).

Die Versuche zeigen, daß insbesondere bei den hohen Proteasekonzentrationen (5,5 bis 22 µg AP, 2,2 bis 10 µg Ela pro Kultur) eine höhere Stimulation durch die hitzeinaktivierten als durch die nativen Proteasen auftritt. Es ist daher möglich, daß die Hitzeinaktivierung zum Verlust von inhibierenden Faktoren bei hohen Proteasekonzentrationen führt oder aber zur Freisetzung von zusätzlichen stimulierenden Determinanten auf den Proteasemolekülen.
Ein toxischer Einfluß von AP und Ela auf Lymphozyten ist aufgrund des negativen Cytotoxizitätstests (4.3.) ausgeschlossen.

Eine bei hoher AP-Konzentration höhere Stimulation durch die hitzeinaktivierte Protease wurde auch von Parmely et al. (55) bei der Stimulation von T-Lymphozyten mit AP nachgewiesen. Er konnte weiter zeigen, daß native AP bei höherer Konzentration (1 - 10 µg pro Kultur) eine immunsuppressive Wirkung auf mit Mumpsviren stimulierte Kulturen hat, die durch Hitzeinaktivierung der AP reversibel war.

Zu Versuchsbeginn lagen die Untersuchungen von Parmely et al. (55) noch nicht vor, und es war nicht auszuschließen, daß LPS die Stimulation beeinflußt.
Eine Verunreinigung mit LPS, einem Bestandteil gram-negativer Bakterien, ist bei der Aufarbeitung biologischer Substanzen nie auszuschließen.
Eine Kontamination mit LPS stellt besonders bei immunologischen Versuchen ein Problem dar, weil LPS selbst ein spezifisches B-Zell-Mitogen ist und somit die Stimulation von Lymphozyten überlagern kann (1, 70).
Die deswegen über den KDO-Test durchgeführte LPS-Bestimmung ergab eine Kontamination der AP mit 51 µg LPS/mg AP und der Ela mit 11,4 µg LPS/mg Ela.

Um einen Einfluß von LPS bei der Stimulation durch AP und Ela auszuschließen, wurde daher die C_3H/HeJ-Maus verwendet.
Die C_3H/HeJ-Maus stellt insofern eine Besonderheit dar, als sie ein mutiertes Gen LPS^d besitzt, das eine fehlende Immunantwort auf LPS bedingt (80, 81, 82). Die C_3H/HeJ-Lymphozyten proliferieren nicht, wenn sie LPS-Präparationen ausgesetzt werden, und weisen auch keine Antikörperproduktion auf. Die Reaktion auf andere Mitogene bleibt dagegen unbeeinflußt (3).
Unter dieser Voraussetzung müßte die Stimulation der C_3H/HeJ-Milzzellen also allein Proteasen-bedingt sein.

Im Gegensatz dazu wiesen Pier et al. (60) allerdings nach, daß LPS von P. aeruginosa in einer Konzentration von 2,5

bis 50 µg/ml doch zu einer Stimulation von C_3H/HeJ-Zellen führt, und sie folgerten daraus, daß die Unfähigkeit zur Reaktion auf LPS auf die Familie der Enterobacteriaceen beschränkt ist. Außerdem soll die prinzipielle Fähigkeit zur Stimulation von der Methode der LPS-Extraktion abhängig sein (46, 71).

Aufgrund dieser Aussagen schien nun die C_3H/HeJ-Maus kein ganz eindeutiges Kriterium mehr zum Ausschluß einer LPS-Stimulation zu sein. Daher wurden zusätzliche Versuche mit Polymyxin B durchgeführt.
Polymyxin B ist ein zyklisches Peptid-Antibiotikum, das sich an den Lipid A-Teil von LPS anlagert und dadurch die biologische Aktivität von LPS verhindert, unter anderem auch die Mitogenität gegenüber Lymphozyten (45).

Die Versuche mit Polymyxin B zeigen, daß die native und die hitzeinaktivierte AP und Ela maximal 6 bis 7 mal stärker durch Polymyxin B gehemmt werden als Con A, das im signifikanten Stimulationsbereich um maximal 9 % gehemmt wird. Die von Pier et al. (60) beschriebene Hemmung von P. aeruginosa-LPS von 83,1 % wird nicht erreicht. Im Gegensatz zu Pier bleibt noch eine erhebliche Mitogenität von AP und Ela bestehen. Selbst unter der Annahme einer potentiellen Beteiligung von LPS an der Stimulation wäre somit noch eine mitogene Wirkung von AP und Ela vorhanden.

Eine Reduktion der Stimulation der Milzzellen mit AP und Ela ließ sich auch durch Antikörper gegen die Proteasen erzielen. Dies beweist die Spezifität der Stimulation durch AP und Ela.

Die LPS-Bestimmung der Antikörper gegen AP und Ela hatte ebenfalls eine Kontamination von anti-AP-IgG mit 2,5 µg LPS/mg und von anti-Ela-IgG mit 1,6 µg LPS/mg ergeben. Da die Antikörper im Überschuß eingesetzt wurden, entsprachen die LPS-Endkonzentrationen denen der vorangegangenen Versuche.

Unter der Annahme einer potentiellen LPS-Stimulation der Milzzellen sollten die Antikörper bei dieser Kontamination ebenfalls eine Stimulation bewirken.
Es fand aber keine Stimulation der C_3H/HeJ-Zellen durch die Antikörper gegen AP und Ela statt; daher ist ein Effekt von LPS auf die Stimulation ausgeschlossen.
Es ist eher anzunehmen, daß Makromoleküle, spezifischer Art wie die Antikörper oder unspezifischer Art wie Polymyxin B, die Interaktion der Proteasen mit den Milzzellen behindern und somit die Stimulation hemmen.

Die Versuche belegen nun, daß AP und Ela zur Stimulation von immunkompetenten Zellen führen, wobei Ela zu einer fast doppelt so hohen Proliferation der Milzzellen führt. Die Proteasen werden wahrscheinlich nicht an einen Rezeptor gebunden, sondern nehmen nur kurzen Kontakt mit den Milzzellen auf (4.2.).

Die Spannbreite der Stimulation von AP, 0,2 bis 22 µg AP pro Kultur, ist bei weitem geringer als die von Parmely et al. (55) angegebene Spannbreite der AP von 10^{-5} bis 10^{-1} µg pro Kultur, die zu einer Stimulation von T-Lymphozyten führt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß Parmely mehr Zellen verwendet hat ($2x10^7$ pro Kultur), Makrophagen in den Inkubationsansätzen hatte, oder darauf, daß er länger inkubiert hat (7 Tage).

Ob durch AP und Ela B- oder T-Lymphozyten stimuliert werden, kann anhand der vorliegenden Versuche nicht differenziert werden.

Es gibt Hinweise darauf, daß T-Lymphozyten die hauptsächlich proliferierenden Lymphozyten gegenüber P. aeruginosa sind (55, 63). Es besteht eine Verbindung zwischen erhöhter Mortalität und dem Verlust der T-Zell-vermittelten Immunität bei Patienten mit Cystischer Fibrose (47), und es wurde bei Mäusen gezeigt, daß eine spezifische Immunität gegen P. aeruginosa über Thy 1^+-Zellen übertragen werden kann (61).

Andererseits sind bei Patienten mit Cystischer Fibrose hohe Antikörpertiter gegen AP und Ela nachweisbar, die auf eine kontinuierliche Stimulation der B-Lymphozyten hinweisen (13).

Es kann auch nicht differenziert werden, ob es sich bei der mit AP und Ela erzielten Stimulation um eine mitogene oder antigene Stimulation handelt.
Eine antigene Stimulation erfordert eine bereits früher vorausgegangene Antigenexposition und eine Antigenrepräsentierung durch Makrophagen (28).
Es gibt Hinweise darauf, daß die Stimulation durch P. aeruginosa Antigen-bedingt ist (63) und daß AP und Ela die hauptsächlichen Antigene von P. aeruginosa bei der Stimulation von T-Lymphozyten sind (55).

Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von AP und Ela bei der Aktivierung immunkompetenter Zellen.
Weitere Untersuchungen sind aber notwendig, um die Interaktion von AP und Ela mit den verschiedenen Zellen des Immunsystems zu analysieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Alkalische Protease und Elastase, zwei Exoproteasen von P. aeruginosa, wurden isoliert und gereinigt. Die Wirkung der beiden Proteasen auf Zellen wurde untersucht.

AP und Ela übten einen cytopathischen und letalen Effekt auf menschliche Lungenfibroblasten aus, der konzentrations- und zeitabhängig war. Der Effekt der Ela war jeweils stärker als der der AP.

Mit Hilfe eines Radioimmunoassay wurde eine Adhärenz von AP und Ela an menschliche Lymphozyten, Granulozyten und an Mausmilzzellen nachgewiesen.

Eine cytotoxische Wirkung der Proteasen auf Lymphozyten und Granulozyten konnte mikroskopisch nicht nachgewiesen werden.

AP und Ela führten zur Stimulation von C_3H/HeJ-Mausmilzzellen, wobei Ela zu einer fast doppelt so hohen Proliferation der Zellen wie AP führte.

Hitzeinaktivierung der Proteasen reduzierte die Stimulation nicht. Die Stimulation der Milzzellen wird also nicht über die proteolytische Wirkung vermittelt, sondern über eine nichtenzymatische strukturelle Komponente.

Antikörper gegen AP und Ela, die zur Reduktion der Stimulation führten, bewiesen die spezifische Wirkung von AP und Ela bei der Stimulation der Zellen.

Um einen synergistischen Effekt von LPS bei der Stimulation der Milzzellen auszuschließen, wurde LPS über den KDO-Test bestimmt. Es wurde eine Kontamination von AP, Ela und deren Antikörper mit LPS festgestellt.

Zusätzliche Versuche mit Polymyxin B, das die stimulierende Wirkung von LPS spezifisch hemmt, schlossen zusammen mit der Tatsache, daß die Antikörper trotz LPS-Kontamination keine Stimulation aufwiesen, einen synergistischen Effekt von LPS bei der Stimulation aus.
Es ist eher anzunehmen, daß Makromoleküle wie Antikörper oder Polymyxin B die zur Stimulation nötige Interaktion von AP und Ela mit den Milzzellen hemmen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß AP und Ela biologisch unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Zellen haben; dies unterstreicht deren pathogenetische Bedeutung im Rahmen von Infektionen mit P. aeruginosa.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anderson, J., Melchers, F., Galanos, C., Lüderitz, O.: The mitogenic effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule. J. Exp. Med. 137, 943-953 (1973)

2. Bernheimer, A.W.: Interaction between membranes and cytolytic bacterial toxins. Biochim. Biophys. Acta 344, 27-50 (1974)

3. Bona, C.: Resemblance of blast response of C_3H/HeJ mouse and rabbit spleen lymphocytes to B-cell mitogenic components of E. coli cell walls. Immunol. Commun. 5, 37-39 (1976)

4. Bøyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Invest. 21, 77-89 (1968)

5. Bradley, K.B., Kawanami, O., Ferrans, V.J., Crystal, R.G.: The fibroblast of human alveolar structures: A differentiated cell with a major role in lung structure and function; in: "Methods in cell biologie", Vol. 21, 38-62 (1980), edited by Harris, C.C., Trump, B.F., Stoner, G.D., Academic Press, New York

6. Brownstein, D.G., Johnson, E.: Experimental nasal infection of normal and leucopenic mice with Pseudomonas aeruginosa. Vet. Pathol. 19, 169-178 (1982)

7. Bullen, J.J., Wallis, S.N., Griffiths, E.: The effect of antipolymorphonuclear leucocyte serum on Pseudomonas aeruginosa infection in rabbits. Immunology 30, 603-610 (1976)

8. Chen, Y.U., Hancock, R.E.W., Mishell, R.J.: Mitogenic effects of purified outer membrane proteins from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 28, 178-184 (1980)

9. Cicmanec, J.F., Holder, I.A.: Growth of Pseudomonas aeruginosa in normal and burned skin extract: role of extracellular proteases. Infect. Immun. 23, 477-483 (1979)

10. Costerton, J.W.: The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: A hypothesis. Rev. Infect. Dis. 6, Suppl. 3, 608-616 (1984)

11. Döring, G., Obernesser, H.-J., Botzenhart, K.: Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa. II. Effect of two proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 249, 89-98 (1981)

12. Döring, G., Obernesser, H.-J., Botzenhart, K.: Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa III. Radioimmunoassay for detection of alkaline protease. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 252, 239-247 (1982)

13. Döring, G., Høiby, N.: Longitudinal study of immune response to Pseudomonas aeruginosa antigens in cystic fibrosis. Infect. Immun. 42, 197-201 (1983)

14. Döring, G., Obernesser, H.J., Botzenhart, K., Flehmig, B., Høiby, N., Hofmann, A.: Proteases of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 147, 744-750 (1983)

15. Döring, G., Dalhoff, A., Vogel, O., Brunner, H., Dröge, U., Botzenhart, K.: In vivo activity of proteases of Pseudomonas aeruginosa in a rat model. J. Infect. Dis. 149, 532-537 (1984)

16. Döring, G., Buhl, V., Høiby, N., Schiøtz, P.O., Botzenhart, K.: Detection of proteases of Pseudomonas aeruginosa in immune complexes isolated from sputum of cystic fibrosis patients. Acta path. microbiol. Immunol. Scand. Sect. C 92, 307-312 (1984)

17. Döring, G., Goldstein, W., Röll, A., Schiøtz, P.O., Høiby, N., Botzenhart, K.: Role of Pseudomonas aeruginosa exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. Infect. Immun. 49, 557-562 (1985)

18. Garzelli, C., Campa, M., Colizzi, V., Benedettini, G., Falcone, G.: Evidence for autoantibody production associated with polyclonal B-cell activation by Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 35, 13-19 (1982)

19. Gisler, R.H., Vischer, T.L., Dukor, P.: Trypsin increases in vitro antibody synthesis and substitutes for helper T cells. J. Immunol. 116, 1354-1357 (1976)

20. Gray, L., Kreger, A.: Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by Pseudomonas aeruginosa proteases. Infect. Immun. 23, 150-159 (1979)

21. Hanson, L.A., Andersson, B., Carlsson, B., Cruz, J.R., Dahlgren, U., Mattsby Baltzer, I., Svanborg Eden, C.: The secretory IgA system and mucosal defence. Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 24, 13-21 (1980)

22. Høiby, N.: Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 262, 58-71 (1977)

23. Høiby, N.: Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. Acta Paediatr. Scand. Suppl. 301, 33-54 (1982)

24. Holder, I.A., Haidaris, C.G.: Experimental studies of the pathogenesis of infections due to Pseudomonas aeruginosa: extracellular protease and elastase as in vitro virulence factors. Can. J. Microbiol. 25, 593-599 (1979)

25. Holder, I.A., Wheeler, R.: Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to Pseudomonas aeruginosa: elastase, an IgG protease. Can. J. Microbiol. 30, 1118-1124 (1984)

26. Holt, P.S., Misfeldt, M.L.: Alteration of murine response by Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Infect. Immun. 45, 227-233 (1984)

27. Homma, J.Y., Abe, C., Tanamoto, K., Hirao, J., Morihara, K., Tsuzuki, H., Yanagawa, R., Honda, E., Aoi, Y., Fujimoto, Y., Goryo, M., Imazeki, N., Noda, H., Goda, A., Takeuchi, S., Ishihara, T.: Effectiveness of immunization with single and multi-component vaccines prepared from a common antigen (OEP), protease and elastase toxoids of Pseudomonas aeruginosa on protection against hemorrhagic pneumonia in mink due to Pseudomonas aeruginosa. Jpn. J. Exp. Med. 48, 111-133 (1978)

28. Hood, L.E., Weissman, J.L., Wood, W.B.: Immunology. Hall, J., ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California (1978)

29. Hynes, R.O., Yamada, K.M.: Fibronectins: Multifunctional modular proteins. J. Cell Biol. 95, 369-377 (1982)

30. Issekutz, T.B., Stoltz, J.M.: Suppression of lymphocyte proliferation by Pseudomonas aeruginosa-activated suppressor monocytes. Infect. Immun. 48, 832-838 (1985)

31. Jann, K.: Heterogeneity of lipopolysaccharides analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Eur. J. Biochem. 60, 238-246 (1975)

32. Johnson, D.A., Carter-Hamm, B., Dralle, W.M.: Inactivation of human bronchial mucosial proteinase inhibitor by Pseudomonas aeruginosa elastase. Am. Rev.Resp. Dis. 926, 1070-1073 (1982)

33. Kaplan, J.G., Bona, C.: Proteases as mitogens. Exp. Cell Res. 88, 388-394 (1974)

34. Kawahara, K., Abe, C., Homma, I.Y., Kawane, M., Gotoh, T., Tanaka, N., Morihara, K.: Corneal ulcers caused by protease and elastase from Pseudomonas aeruginosa. Jpn. J. Exp. Med. 44, 435-442 (1974)

35. Kawaharajo, K., Homma, J.Y.: Pathogenesis of the mouse keratitis produced with Pseudomonas aeruginosa. Jpn. J. Exp. Med. 45, 515-524 (1975)

36. Kawaharajo, K., Homma, J.Y., Aoyama, Y., Morihara, K.: In vivo studies on protease and elastase from Pseudomonas aeruginosa. Jpn. J. Exp. Med. 45, 89-100 (1975)

37. Kharazmi, A., Döring, G., Høiby, N., Valerius, N.H.: Interaction of Pseudomonas aeruginosa alkaline protease and elastase with human polymorphonuclear leukocytes in vitro. Infect. Immun. 43, 161-165 (1984)

38. Kharazmi, A., Høiby, N., Döring, G., Valerius, N.H.: Pseudomonas aeruginosa exoproteases inhibit human neutrophil chemoluminescence. Infect. Immun. 44, 687-591 (1984)

39. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)

40. Lowry, O.H., Rousebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

41. Morihara, K.: Production of elastase and proteinase by Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 88, 745-757 (1964)

42. Morihara, K., Tsuzuki, H.: Production of protease and elastase by Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients. Infect. Immun. 15, 679-685 (1977)

43. Morihara, K., Tsuzuki, H., Oda, K.: Protease and elastase of Pseudomonas aeruginosa: Inactivation of human plasma α1-proteinase inhibitor. Infect. Immun. 24, 188-193 (1979)

44. Morrison, A.J. Jr., Wenzel, R.P.: Epidemiology of infections due to Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 6, Suppl. 3, 627-642 (1984)

45. Morrison, D.C., Jacobs, D.M.: Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. Immunochemistry 13, 813-818 (1976)

46. Morrison, D.C., Curry, B.J.: The use of polymyxin B and C_3H/HeJ mouse spleen cells as criteria for endotoxin contamination. J. Immunol. Methods 27, 83-92 (1979)

47. Munster, A.M., Winchurch, R.A., Burmingham, W.J., Keeling, P.: Longitudinal assay of lymphocyte responsiveness in patients with cystic fibrosis. Ann. Surg. 192, 772-775 (1980)

48. Nicas, T.I., Iglewski, B.H.: The contribution of exoproducts to virulence of Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Microbiol. 31, 387-392 (1985)

49. Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980)

50. Obernesser, H.J., Döring, G., Botzenhart, K.: Extrazelluläre Toxine von Pseudomonas aeruginosa. I. Reinigung und Charakterisierung zweier Exoproteasen. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A) 249, 76-88 (1981)

51. Obrig, T.G., Baltch, A.L., Moran, T.P., Mudzinski, S. P., Smith, R.P., Lutz, F.: Effect of Pseudomonas aeruginosa cytotoxin on thymidine incorporation by murine splenocytes. Infect. Immun. 45, 756-760 (1984)

52. Okada, K., Kawaharajo, K., Homma, J.Y., Aoyama, Y., Kubota, Y.: Studies on the pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa by the use of ligated rabbit intestines (the De test), Jpn. J. Exp. Med. 46, 245-256 (1976)

53. Osborn, M.J.: Studies on the gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. 50, 499-506 (1963)

54. Otani, T., Katami, K., Une, T., Osada, Y., Ogawa, H.: Nonbacteremic Pseudomonas aeruginosa pneumonia in immunosuppressed guinea pigs. Microbiol. Immunol. 26, 67-76 (1981)

55. Parmely, M.J., Iglewski, B.H., Horvat, R.T.: Identification of the principal T lymphocyte-stimulating antigens of Pseudomonas aeruginosa. J. Exp. Med. 160, 1338-1349 (1984)

56. Pavlovskis, O.R., Wretlind, B.: Assessment of protease (elastase) as a Pseudomonas aeruginosa virulence factor in experimental mouse burn infection. Infect. Immun. 24, 181-187 (1979)

57. Pennington, J.E., Ehrie, M.G., Hickey, W.F.: Host defense mechanisms against pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 6, Suppl. 3, 657-666 (1984)

58. Petrini, B., Möllby, R.: Activation of human lymphocytes in vitro by membrane damaging toxins from Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 31, 952-956 (1981)

59. Phillips, H.J.: In "Tissue Culture: Methods and application". Kruse, P.F., Jr., Patterson, M.K., Jr., eds. p. 406. Academic Press, New York (1973)

60. Pier, G.B., Markham, R.B., Eardley, D.: Correlation of the biological responses of C_3H/HeJ mice to endotoxin with the chemical and structural properties of the lipopolysaccharides from Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. J. Immunol. 127, 184-191 (1981)

61. Pier, G.B., Markham, R.B.: Induction in mice of cell-mediated immunity to Pseudomonas aeruginosa by high molecular weight polysaccharide and vinblastin. J. Immunol. 128, 2121-2125 (1982)

62. Pollack, M.: The virulence of Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 6, Suppl. 3, 617-626 (1984)

63. Porwoll, J.M., Gebel, H.M., Rodey, G.E., Markham, R.B.: In vitro response of human T cells to Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 40, 670-674 (1983)

64. Prestidge, L., Gaga, V., Spizizen, J.: Protease activities during the course of sporulation in Bacillus subtilis. J. Bact. 107, 815-823 (1971)

65. Rola-Pleszczynski, M., Lieu, H., Hamel, J., Lemaire, I.: Stimulated human lymphocytes produce a soluble factor which inhibits fibroblast migration. Cell. Immunol. 74, 104-110 (1982)

66. Sabath, L.D.: Biochemical and physiological basis for susceptibility and resistance of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobial agents. Rev. Infect. Dis. 6, Suppl. 3, 643-656 (1984)

67. Sbarra, A.J., Selvaraj, R.J., Paul, B.B., Poskitt, P.K.F., Zgliczynski, J.M., Mitchell, G.W., Jr., Louis, F.: Biochemical, functional and structural aspects of phagocytosis. Int. Rev. Exp. Path. 16, 249-271 (1976)

68. Schimpff, S.C., Greene, W.H., Young, V.M., Wiernik, P.H.: Significance of Pseudomonas aeruginosa in the patient with leukemia or lymphoma. J. Infect. Dis. 130, Suppl., 24-32 (1974)

69. Schultz, D.R., Miller, K.D.: Elastase of Pseudomonas aeruginosa: Inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. Infect. Immun. 1, 128-135 (1974)

70. Skidmore, B.J., Chilles, J.M., Morrison, D.C., Weigle, W.O.: Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharides (LPS): Correlation between the mitogenic adjuvant, and immunogenic activities. J. Immunol. 114, 770-778 (1975)

71. Skidmore, B.J., Morrison, D.C., Chilles, J.M., Weigle, W.O.: Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharides (LPS). II. The unresponsiveness of C_3H/HeJ mouse spleen cells is dependent on the method used to extract LPS. J. Exp. Med. 142, 1488-1508 (1975)

72. Snell, K., Holder, I.A., Leppla, S.A., Saelinger, C.B.: Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infection with Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 19, 839-845 (1978)

73. Sorensen, R.U., Klinger, J.D., Cash, H.A., Chase, P.A., Dearborn, D.G.: In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by Pseudomonas aeruginosa phenazine pigments. Infect. Immun. 41, 321-330 (1983)

74. Stein-Streilein, J., Hart, D.A.: Exogenous protease promotes specific antibody forming cell response in vitro. Cell. Immunol. 54, 284-292 (1980)

75. Suter, S., Schaad, U.B., Roux, L., Nydegger, U.E., Waldvogel, F.A.: Granulocyte neutral proteases and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 149, 523-531 (1984)

76. Thelestam, M., Möllby, R.: Classification of microbial, plant and animal cytolysins based on their membrane-damaging effect on human fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 344, 27-50 (1979)

77. Thomassen, J.J., Klinger, J.D., Wiennie, G.B., Wood, R.E., Burtner, C., Thomashefski, J.F., Horowitz, J.G., Tandler, B.: Pulmonary cellular response to chronic irritiation and chronic Pseudomonas aeruginosa pneumonia in cats. Infect. Immun. 45, 741-747 (1984)

78. Vischer, T.L.: Stimulating effect of neutral proteases on cells in vitro. In: "Future trends in inflammation". II Birkenhäuser Verlag, Basel (1975)

79. Vischer, T.L., Bretz, U., Baggiolini, M.: In vitro stimulation of lymphocytes by neutral proteinases from human polymorphonuclear leukocyte granules. J. Exp. Med. 144, 863-872 (1976)

80. Vogel, S.N., Madonna, G.S., Wahl, L.M., Rick, P.D.: In vitro stimulation of C_3H/HeJ spleen cells and macrophages by a lipid a precursor molecule derived from Salmonella typhimurium. J. Immunol. 132, 347-353 (1984)

81. Watson, J., Riblet, R.: Genetic control to bacterial polysaccharide in mice. II. A gene that influences a membrane component involved in the activation of bone marrow derived lymphocytes by polysaccharide. J. Immunol. 114, 1462-1468 (1975)

82. Watson, J., Kelly, K., Largen, M., Taylor, B.A.: The genetic mapping of defective LPS response gene in C_3H/HeJ mice. J. Immunol. 120, 422-424 (1978)

83. Weber, B., Nickol, M.M., Jagger, K.S., Saelinger, C.B.: Interaction of pseudomonas exoproducts with phagocytic cells. Can. J. Microbiol. 28, 679-685 (1982)

84. Woods, D.E., Straus, D.C., Johanson, W.G.Jr., Berry, V.K., Bass, J.A.: Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian buccal epithelial cells. Infect. Immun. 29, 1146-1151 (1980)

85. Woods, D.E., Straus, D.C., Johanson, W.G. Jr., Bass, J.A.: Role of fibronectin in the prevention of adherence of Pseudomonas aeruginosa to buccal cells. J. Infect. Dis. 143, 784-790 (1981)

86. Yoshiki, O., Masatsuga, I., Hideaki, M., Shozo, N.: Cytotoxicity of Pseudomonas aeruginosa against phagocytic cells in peritoneal cavity of guinea pigs. Jpn. J. Bact. 32, 469-475 (1977)

Lebenslauf

Am 2. November 1952 wurde ich, Marga Ingrid Mayer, als Tochter des Kriminalbeamten Eberhard Mayer und seiner Ehefrau Ottilie, geb. Theinl, in Ludwigsburg geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Justinus-Kerner-Schule in Ludwigsburg, von 1964 bis 1973 das Goethe-Gymnasium, wo ich am 6. Juni 1973 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1973/74 studierte ich Agrarbiologie an der Universität in Hohenheim. Im Sommersemester 1974 begann ich das Studium der Biologie an der Albert-Magnus-Universität in Köln, das ich ab dem Wintersemester 1974/75 an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen fortsetzte. Am 7. April 1976 legte ich dort das Vordiplom in Biologie ab, am 22. Juli 1980 das Diplom im Hauptfach Mikrobiologie und in den Nebenfächern Genetik, Biochemie und Zoophysiologie. Meine Diplomarbeit führte ich am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, Prof. Dr. H. Zähner, der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. K. Poralla durch. Sie hatte das Thema: "Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von Phenylalanin-auxotropen Mutanten von Saccharomyces cerevisiae".

Ab dem Sommersemester 1979 studierte ich Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Am 26. August 1980 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab, am 25. März 1982 den 1. Abschnitt und am 20. März 1984 den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Im Praktischen Jahr war ich von April 1984 bis März 1985 in den Städtischen Krankenanstalten Esslingen tätig. Den 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich am 22. April 1985 ab. Die Approbation erhielt ich am 26. April 1985.

Druck Köhler Tübingen